

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia**



**Alteraciones funcionales y actividad epiléptica en  
modelos animales de epilepsia mioclónica progresiva y  
de demencia frontotemporal**

**TESIS DOCTORAL**

**Ana M<sup>a</sup> García Cabrero**

**Madrid, 2012**

**Memoria de Investigación presentada por**  
Ana María García Cabrero  
**para optar al grado de**  
Doctor en Ciencias  
por la Universidad Autónoma de Madrid

**El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el IIS-Fundación Jiménez Díaz, bajo la dirección de la Dra. Marina Sánchez y financiado por una beca de la Fundación Conchita Rábago**

*A mi hermano Jose*

## **AGRADECIMIENTOS**

Cuando me embarqué en esta aventura, hace ya 4 años, pensé que faltaba mucho tiempo para sentarme a escribir esto, pero parece que todo llega y aunque sólo sea yo la única que se enfrenta al Tribunal, nada de este trabajo hubiera sido posible sin la ayuda de tantas personas...

Quisiera agradecer en primer lugar a la Dra. Marina Sánchez, por enseñarme tantas cosas, por su paciencia, por ayudarme y apoyarme en todo momento, y como no, por confiar en mí. Gracias por darme esta oportunidad.

Al Dr. José M<sup>a</sup> Serratos, Jefe del Departamento de Neurología, por estar siempre dispuesto a ayudarme con los registros de mis "pacientes" y por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las dudas surgidas durante la realización de este trabajo (a pesar de su apretada agenda).

A la Fundación Conchita Rábago y muy especialmente a Marta Jiménez, nunca se me olvidará la ilusión que sentí el día que me concedisteis la beca. Gracias por la ayuda que brindáis a los becarios para poder llevar a cabo estos trabajos.

A la Dra. Pilar Gómez Ramos, mi tutora, por recibirme amablemente en su despacho cada vez que lo necesitaba y por la lectura crítica de este Trabajo.

Al Dr. Antonio V. Delgado-Escueta por cederme el modelo animal de la enfermedad de Lafora. Al Laboratorio de Microbiología por permitirme utilizar su cuarto del animalario, sin el cual los estudios de comportamiento y de vídeo-EEG no hubieran sido posibles. Al Departamento de Anatomía Patológica por enseñarme a usar el microtomo y por realizar las tinciones de PAS y especialmente al Dr. José Luís Sarasa por su trato tan cordial y por cederme las imágenes de PAS de la biopsia de un paciente. Al Laboratorio de Neumología por acogerme cuando tuve que usar su microtomo. Al Laboratorio de Nefrología por cederme reactivos y enseñarme a manejar el incluidor y en especial a Esther y Sebas.

A todos los que trabajan en el Animalario: Dr. Carlos Castilla, Juani, Pilar, María Luisa, Carlos y Alberto por lo bien que han cuidado mi material de trabajo. Y en especial a Carlos por hacerme más amenas las interminables horas que duran los test de comportamiento. A Toñi y a Boni, las señoras de la limpieza, siempre dispuestas a alegrarme la mañana con sus historias.

Y esta Tesis no sería lo mismo sin mis compañeros de laboratorio, con los que he

compartido tantas horas cada día: a Rosa, a la cual he recurrido en muchos momentos de dudas y con la que he compartido muchas conversaciones. Gracias por tu apoyo y tus ánimos porque es un regalo conocer gente como tú, no cambies nunca. A Carmen, la mejor Técnico que he conocido, eres una gran profesional, siempre dispuesta a ayudar y a aprender, además de ser una compañera, has sido y sigues siendo una amiga. A Raúl, siempre preparado para ayudarme con el tema informática, por transmitir tanta paz y por esas conversaciones y alguna que otra caña. A Laura, que has sido la penúltima en llegar pero has conseguido que te considere como mi hermana pequeña. Gracias porque siempre has estado dispuesta a apoyarme y a escucharme en mis momentos de “crisis” y sobretodo porque hiciste el gran esfuerzo de ayudarme con alguna operación y algún test de comportamiento, a pesar de que no te gustan los ratones. A Gema, la nueva Técnico, que aunque hemos estado poco tiempo juntas, has demostrado ser una excelente compañera siempre brindándome tu ayuda y sobre todo, una gran persona. A Asunción, mi vecina de ordenador y la entropía personificada, por ser tan buena persona, por ser siempre tan amable conmigo y por animarme tanto. Realizas una labor social admirable, no la abandones nunca. A los clínicos del Departamento de Neurología: a Ainhoa por enseñarme a leer registros, a Andreu por ayudarme con muchos de los registros y a Bea por sus ánimos, por sus consejos y por impedir que me hundiera. Eres un gran médico y una gran persona.

Hay también otras personas que, sin pertenecer al Laboratorio de Neurología, han sido partícipes de este trabajo, ayudándome con mucho cariño y dedicándome parte de su tiempo: a Jimena por ayudarme con el papeleo y a las del Laboratorio de MNH: Nieves, Alicia y Zaida gracias por los ánimos que me habéis dado, por vuestros consejos y por vuestra amistad. Será difícil olvidar esos momentos que me habéis hecho pasar durante las comidas.

Y por último, pero no por eso menos importante... A mis padres porque sin su sacrificio no hubiera podido llegar hasta aquí. Lo habéis dado todo por mí, sois las personas más luchadoras que conozco. Gracias por todo vuestro apoyo, por vuestra generosidad, por vuestra bondad, por vuestros consejos y por entenderme. Espero que estéis muy orgullosos de mí. Y a mi hermana y mis sobrinos, por apoyarme incondicionalmente todo este tiempo, por su confianza en mí y por su cariño. Gracias a todos por estar conmigo en estos momentos, porque todos sabemos que ha sido un año difícil, no sólo profesional sino también personalmente. A Blas mi amigo más fiel. A Miguel, que sólo

él sabe lo que me ha costado esta Tesis y por aguantar mis cambios de humor durante estos años. Gracias por tu paciencia. Al resto mi la familia, tíos, primos, etc. y por supuesto a los que ya no están, como es el caso de mis abus (sobre todo a Marieta la única que conocí, porque la habría dado mucha alegría ver mi sueño cumplido) siempre preocupándose por mi y animándome y muy especialmente a mi tita Patro, la tita de mis ojos, que aunque ya no esté con nosotros, sé que la hubiera hecho mucha ilusión ver este trabajo terminado.

Y muy especialmente a mi hermano Jose, a quien dedico esta Tesis. Gracias por ser un ejemplo a seguir, por tu capacidad de lucha, por ser mi hermano. Gracias por ser la persona que siempre confió en mí, porque en tu despedida, hace ya casi 15 años, me animaste a estudiar Biología y te prometí que lo haría y además no me conformé sólo con eso, sino que estudié Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Gracias por ser la fuerza que me ha impulsado a tirar siempre hacia adelante, porque en mis numerosos momentos de bajón y de tirar la toalla siempre he sentido que no te podía fallar. Siempre he estado orgullosa de ti y te engrandece aún más que todos tus amigos me hablan maravillas de ti y siempre con una sonrisa en los labios. Espero que estés orgulloso de mí como yo lo sigo estando de ti. Ojala estuvieras aquí compartiendo estos momentos conmigo.

A todos los ratones caídos durante la realización de esta Tesis Doctoral.

Y a toda la gente que de una forma u otra ha formado parte de esta aventura.

**Sinceramente, a todos, GRACIAS.**

## ÍNDICE



<b>ÍNDICE.....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>1. Epilepsias y crisis epilépticas.....</b>	<b>20</b>
1.1. Epilepsias mioclónicas progresivas. Enfermedad de Lafora.....	20
1.2. Genes implicados en la enfermedad de Lafora.....	23
1.2.1. Gen <i>EPM2A</i> y proteína laforina.....	24
1.2.2. Gen <i>EPM2B</i> y proteína malina.....	26
1.3. Interacción laforina-malina.....	27
1.4. Metabolismo del glucógeno y enfermedad de Lafora.....	28
1.4.1. Las proteínas laforina y malina y los cuerpos de Lafora.....	28
1.4.2. Las proteínas laforina y malina en la autofagia.....	30
<b>2. Modelos animales para el estudio de epilepsias.....</b>	<b>31</b>
2.1. Modelos farmacológicos para el estudio de las epilepsias.....	31
2.2. Modelos animales de la enfermedad de Lafora.....	32
2.2.1. Modelos de ratón con alteraciones en la expresión de la proteína laforina.....	33
2.2.2. Modelos de ratón con alteraciones en la expresión de la proteína malina.....	34
2.2.3. Modelo canino de la enfermedad de Lafora.....	35

<b>3. Otras enfermedades neurológicas con epilepsia. Demencias y tauopatías.....</b>	<b>35</b>
3.1. Rasgos neuropatológicos de demencias y tauopatías. FTDP-17 y enfermedad de Alzheimer.....	37
3.2. Genética de las demencias y tauopatías.....	39
<b>4. Modelos animales de demencias y tauopatías. FTDP-17 y enfermedad de Alzheimer.....</b>	<b>40</b>
4.1. Modelo transgénico de la proteína tau humana con mutaciones de FTDP-17.....	40
4.2. Epilepsia en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer.....	41
<b>5. Estudios de registros electroencefalográficos con vídeos monitorizados simultáneos.....</b>	<b>42</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>1. Animales de experimentación.....</b>	<b>47</b>
1.1. Ratones <i>Epm2a</i> <sup>-/-</sup> .....	47
1.2. Ratones <i>Epm2b</i> <sup>-/-</sup> .....	47
1.3. Ratones <i>Tau</i> <sup>VLW</sup> .....	48
1.4. Ratones control.....	48
1.5. Mantenimiento de los animales.....	48
1.6. Genotipado.....	48
<b>2. Análisis histopatológicos.....</b>	<b>49</b>

2.1. Fijación e inclusión en parafina.....	50
2.2. Cortes histológicos.....	50
2.3. Tinción del ácido periódico de Schiff ( <i>periodic acid-Schiff</i> , PAS).....	50
2.4. Inmunohistoquímica.....	51
2.5. Microscopia óptica.....	52
<b>3. Estudios de comportamiento motor.....</b>	<b>52</b>
3.1. Análisis de la actividad motora en el actímetro.....	52
3.2. Experimentos de coordinación motora y equilibrio en el rotarod.....	53
3.3. Estudios de las alteraciones de postura y discinesias mediante el test de suspensión de la cola.....	53
<b>4. Estudios de memoria mediante el test de reconocimiento de objetos.....</b>	<b>53</b>
<b>5. Análisis estadísticos.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Registros de vídeo-EEG.....</b>	<b>54</b>
6.1. Elaboración de los electrodos.....	54
6.2. Implantación de los electrodos intracraneales en ratones.....	55
6.3. Registro de vídeo-EEG.....	58
6.4. Administración de PTZ.....	60
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>1. Modelos animales de la enfermedad de Lafora.....</b>	<b>62</b>
1.1. Ratones nulos para la expresión de la proteína laforina.....	62

1.1.1. Presencia de cuerpos de Lafora en los ratones <i>Epm2a</i> <sup>-/-</sup> .....	62
1.1.2. Alteraciones de la actividad motora en los ratones deficientes para la expresión de laforina.....	64
1.1.3. Alteraciones de la coordinación motora y del equilibrio en los ratones <i>Epm2a</i> <sup>-/-</sup> .....	67
1.1.4. Discinesias y posturas anormales en el test de suspensión de la cola.....	68
1.1.5. Déficit de la memoria episódica en los ratones <i>Epm2a</i> <sup>-/-</sup> .....	69
1.1.6. Actividad electroencefalográfica cortical de los ratones <i>Epm2a</i> <sup>-/-</sup> .....	70
1.1.7. Cambios en la sensibilidad al tratamiento con PTZ en los ratones <i>Epm2a</i> <sup>-/-</sup> .....	71
<b>1.2. Ratones nulos para la expresión de la proteína malina.....</b>	<b>76</b>
1.2.1. Presencia de cuerpos de Lafora en ratones <i>Epm2b</i> <sup>-/-</sup> .....	76
1.2.2. Alteraciones de la actividad motora en los ratones deficientes para la expresión de malina.....	78
1.2.3. Alteraciones de la coordinación motora y del equilibrio en los ratones <i>Epm2b</i> <sup>-/-</sup> .....	80
1.2.4. Discinesias y posturas anormales en el test de suspensión de la cola.....	81
1.2.5. Déficit de la memoria episódica en los ratones <i>Epm2b</i> <sup>-/-</sup> .....	82
1.2.6. Actividad electroencefalográfica cortical de los ratones <i>Epm2b</i> <sup>-/-</sup> .....	83
1.2.7. Cambios en la sensibilidad al tratamiento con PTZ en los ratones <i>Epm2b</i> <sup>-/-</sup> .....	84
<b>2. Modelo de demencia frontotemporal: ratones <i>Tau</i><sup>VLW</sup>, transgénicos de la proteína tau humana con mutaciones de FTDP-17.....</b>	<b>88</b>
<b>2.1. Expresión del transgen hTauVLW en el cerebro de los ratones <i>Tau</i><sup>VLW</sup> .....</b>	<b>89</b>

2.2. Presencia de agregados de tau hiperfosforilado en el cerebro de los ratones <i>Tau<sup>VLW</sup></i> .....	91
2.3. Actividad electroencefalográfica cortical de los ratones <i>Tau<sup>VLW</sup></i> .....	92
2.4. Cambios en la sensibilidad al tratamiento con PTZ en los ratones <i>Tau<sup>VLW</sup></i> .....	94
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>100</b>
1. Los modelos animales de la enfermedad de Lafora <i>Epm2a<sup>-/-</sup></i> y <i>Epm2b<sup>-/-</sup></i> .....	101
2. El modelo animal de la FTDP-17, los ratones <i>Tau<sup>VLW</sup></i> .....	108
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>112</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>115</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>128</b>

## **ABREVIATURAS**

**Terminología inglesa:** se ha evitado, en la medida de lo posible, el empleo de términos ingleses, salvo aquellos en los que por su difícil traducción y/o estar ampliamente aceptados por la comunidad científica internacional se ha preferido mantener.

Amyg	amígdala
APP	proteína precursora del amiloide
$\beta$ A	péptido $\beta$ -amiloide
CA	( <i>Cornu Ammonis</i> ) cuerno de Amón
CBD	( <i>Carbohydrate Binding Domain</i> ) dominio de unión a carbohidratos
DCB	degeneración corticobasal
DG	giro dentado
DSPD	( <i>Dual Specificity Phosphatase Domain</i> ) dominio proteína tirosina fosfatasa de especificidad doble
EEG	electroencefalograma
EMPs	epilepsias mioclónicas progresivas
EPM2A	( <i>epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene A</i> ) gen A de la epilepsia mioclónica progresiva tipo 2
EPM2B	( <i>epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene B</i> ) gen B de la epilepsia mioclónica progresiva tipo 2
FTDs	demencias frontotemporales
FTDP-17	Demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	receptor de GABA, tipo A

GBE	( <i>glycogen branching enzyme</i> ) enzima ramificante de glucógeno
GDE	( <i>glycogen debranching enzyme</i> ) enzima desramificante de glucógeno
GP	glucógeno fosforilasa
GPK	glucógeno fosforilasa quinasa
GS	glucógeno sintasa
hTauVLW	transgen de la proteína tau humana con dos exones en el extremo amino terminal, cuatro repeticiones en el dominio de unión a tubulina y con las mutaciones G272V, P301L y R406W de FTDP-17, bajo el control del promotor específico neuronal Thy-1
ID	índice de discriminación
LI-LVI	capas I a VI de corteza cerebral
mRNA	ARN mensajero
NFTs	( <i>neurofibrillary tangles</i> ) ovillos neurofibrilares
PAS	( <i>periodic acid-Schiff</i> ) tinción del ácido periódico de Schiff
PBS	tampón fosfato salino
PHF	( <i>paired helical filaments</i> ) neurofilamentos helicoidales apareados
PP1	proteína fosfatasa tipo 1
<i>PSEN1</i>	gen de la presenilina 1
<i>PSEN2</i>	gen de la presenilina 2
PSP	parálisis supranuclear progresiva
PTG	( <i>protein targeting to glycogen</i> ) enzima que dirige proteínas al glucógeno
PTZ	pentilenetetrazol



## **RESUMEN**

La enfermedad de Lafora es una epilepsia mioclónica progresiva que se hereda de forma autosómica recesiva, causada por mutaciones en el gen *EPM2A*, que codifica la proteína laforina, y en el gen *EPM2B*, que codifica la proteína malina. El rasgo neuropatológico característico de la enfermedad es la presencia de cuerpos de Lafora, inclusiones citoplasmáticas de poliglucosanos en el sistema nervioso central y en otros órganos y tejidos. En este trabajo se han utilizado dos modelos animales generados mediante manipulación genética de los dos genes conocidos hasta el momento como responsables de la enfermedad de Lafora, los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup>, para analizar las alteraciones neurológicas que aparecen en los mismos a consecuencia de la ausencia de las proteínas codificadas por estos genes. Estos ratones presentan neurodegeneración y acumulación de cuerpos de Lafora en tejidos neuronales y no neuronales. A nivel funcional, la ausencia de estas proteínas produce alteraciones en la actividad y coordinación motoras, déficits en la memoria a corto plazo y discinesias, además de mioclonías que se reflejan en el EEG como puntas, complejos de punta-onda y polipuntas espontáneas. Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> manifiestan también crisis tónico-clónicas espontáneas y una mayor sensibilidad al agente epileptógeno PTZ, antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>. Las alteraciones neurológicas observadas en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> se correlacionan con la presencia de abundantes cuerpos de Lafora en corteza cerebral, hipocampo, núcleos basales, núcleos motores del troncoencéfalo y cerebelo, lo que sugiere que estos agregados podrían causar daños cerebrales que conducirían a alteraciones cognitivas y de comportamiento. Estos modelos de Lafora reproducen fielmente muchas de las características patológicas de la enfermedad, por lo que pueden constituir una herramienta eficaz para el desarrollo de nuevas terapias.

Adicionalmente, en este trabajo se ha estudiado un modelo experimental transgénico de la proteína tau humana con mutaciones de la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17), los ratones *Tau*<sup>V<sup>L</sup>W</sup>, que presentan agregados de tau hiperfosforilado, alteraciones motoras y déficits cognitivos. Estos ratones muestran también crisis epilépticas espontáneas, que se reflejan en el EEG como complejos de punta-onda de frecuencia variable. Además, presentan una sensibilidad notablemente mayor al agente epileptógeno PTZ, reflejando la existencia de alteraciones en los circuitos GABAérgicos. Este modelo constituye un valioso instrumento para el estudio de los factores que influyen en la aparición de crisis epilépticas en determinadas demencias y en otras enfermedades neurodegenerativas.

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. Epilepsias y crisis epilépticas**

Las epilepsias constituyen un grupo de enfermedades neurológicas caracterizadas por la presencia de crisis epilépticas recurrentes no provocadas. Se denomina crisis epiléptica a una alteración brusca de la actividad eléctrica de la corteza cerebral que se manifiesta clínicamente por síntomas motores, síntomas sensitivos, alteraciones de la conducta y/o trastornos de la conciencia y se pueden presentar en el contexto de un síndrome epiléptico o como consecuencia de otras alteraciones neurológicas (Berg et al., 2010). Afectan a 50-100 millones de personas en todo el mundo constituyendo una de las afecciones neurológicas más frecuentes. Existen más de 100 formas distintas de epilepsia que se diferencian en base al tipo de crisis, la etiología, los factores desencadenantes, la edad de comienzo, la gravedad, la cronificación y en ocasiones, al pronóstico y evolución. La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) clasifica las crisis epilépticas en dos grandes grupos principales: crisis generalizadas, cuando la descarga epiléptica afecta a ambos hemisferios cerebrales y crisis parciales o focales, cuando sólo se compromete un hemisferio o parte de éste (Berg et al., 2010).

Las formas más comunes de epilepsias con crisis generalizadas (principalmente crisis de ausencia y crisis tónico-clónicas) presentan un componente genético. Sin embargo, existen otras múltiples causas responsables de la aparición de crisis epilépticas, como son las lesiones en el feto durante el embarazo y/o parto, las lesiones cerebrales adquiridas, como los accidentes vasculares y los tumores, los traumatismos craneales, las infecciones del sistema nervioso central, los trastornos metabólicos adquiridos, el alcohol, así como ciertos productos tóxicos.

Por otra parte, existen numerosas enfermedades neurodegenerativas que presentan un cuadro clínico complejo asociando síntomas de mioclonías y epilepsia, entre ellas la corea de Huntington, la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la enfermedad de Wilson y ciertos casos de enfermedad de Alzheimer.

### **1.1. Epilepsias mioclónicas progresivas. Enfermedad de Lafora**

Las epilepsias mioclónicas progresivas (EMPs) constituyen un grupo de enfermedades neurológicas crónicas de origen genético que están caracterizadas por la

asociación de crisis epilépticas generalizadas tónico-clónicas y mioclonías difusas, presentando frecuentemente un deterioro intelectual. Entre las EPMs, se encuentran la enfermedad de Unverricht-Lundborg, la ceroidolipofuscinosis neuronal, la sialidosis tipo I, el síndrome de MERRF (*Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers*) y la enfermedad de Lafora.

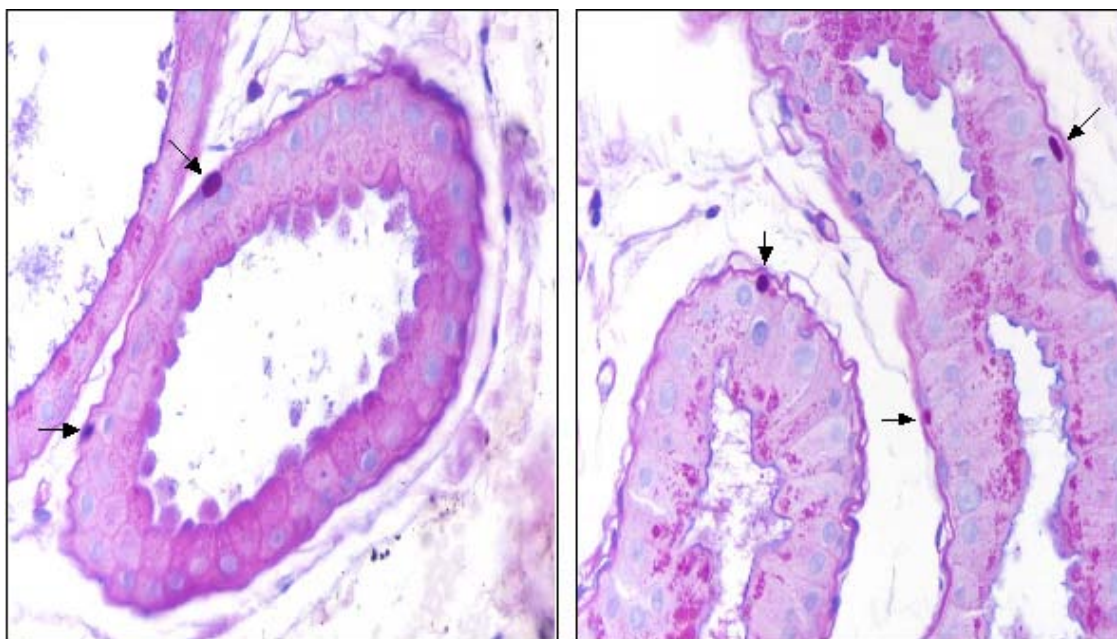
La enfermedad de Lafora (OMIM # [254780](#), ORPHA501) es una epilepsia mioclónica progresiva, que fue descrita en el año 1911 por Gonzalo Rodríguez Lafora y clasificada dentro del grupo de las epilepsias generalizadas (Lafora, 1911; Lafora and Glueck, 1911; Nanduri et al., 2008). Se presenta inicialmente en la adolescencia, más frecuentemente entre los 10 y 17 años de edad, con sus primeras manifestaciones clínicas: crisis generalizadas tónico-clónicas, ausencias, caídas espontáneas súbitas o crisis visuales parciales que rápidamente se continúan con sacudidas mioclónicas asimétricas o generalizadas. La enfermedad evoluciona irremediablemente hacia un empeoramiento clínico y las mioclonías aumentan en frecuencia y se hacen constantes. Con el tiempo aparece una demencia progresiva, apraxia, afasia, amaurosis, mutismo y agotamiento muscular (Berkovic et al., 1986; Chan et al., 2004a; Ganesh et al., 2002b; Van Heycop Ten Ham, 1974) que lleva a los pacientes a un estado vegetativo y a la muerte, normalmente en menos de una década desde la aparición los primeros síntomas (Acharya et al., 1995; Roger J et al., 1992; Van Heycop Ten Ham, 1974). Al principio de la enfermedad, la actividad electroencefalográfica de base es normal pero presenta abundantes descargas de punta-onda que se incrementan con la estimulación luminosa intermitente (ELI). Poco después, el electroencefalograma (EEG) aparece desorganizado con fondo lento y con complejos de punta-onda de 3-6 Hz y polipuntas sincronas, bilaterales y de alto voltaje. Durante los primeros meses desde la aparición de la enfermedad, la actividad basal empeora y aparecen anomalías epileptiformes multifocales además de brotes generalizados. En la fase terminal de la enfermedad, el EEG está muy desorganizado (Berkovic et al., 1991; Van Heycop Ten Ham, 1974). A nivel neuropatológico se observa una abundante pérdida de neuronas sin desmielinización ni inflamación. Todas las regiones del sistema nervioso central se ven involucradas en este proceso, principalmente la corteza cerebral y la corteza cerebelosa, los ganglios basales, los núcleos del cerebelo, el tálamo y el hipocampo. Además, también se observa neurodegeneración en la retina (Carpenter et al., 1974; Schwarz and Yanoff, 1965; Van Heycop Ten Ham, 1974). Hasta el momento no existen tratamientos

preventivos ni curativos para la enfermedad de Lafora y solamente se pueden tratar las crisis con fármacos antiepilépticos, pero los pacientes se hacen resistentes a los mismos con rapidez.

La enfermedad de Lafora es una enfermedad autosómica recesiva (Chan et al., 2003b; Fernandez-Sanchez et al., 2003; Gomez-Abad et al., 2005; Gomez-Garre et al., 2000; Ianzano et al., 2004; Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999; Singh et al., 2005) que se engloba dentro del grupo de las llamadas enfermedades raras (menos de 5 casos por cada 10000 habitantes) y se caracteriza por afectar a ambos sexos por igual, siendo la mayor parte de los casos descritos descendientes de uniones consanguíneas (Acharya et al., 1993; Delgado-Escueta et al., 2001; Serratosa et al., 1995). La mayor parte de los afectos se encuentran en países mediterráneos del Sur de Europa, Oriente Medio, Norte de África, India y Pakistán (Acharya et al., 1993; Delgado-Escueta et al., 2001; Serratosa et al., 1995). Existen también algunos casos aislados en Canadá, Australia, Suecia, EEUU, Costa Rica y Bolivia (Delgado-Escueta et al., 2001).

A nivel histopatológico, la enfermedad de Lafora se caracteriza por la presencia de inclusiones intracelulares que, originariamente, se describieron en el cerebro y médula espinal de un paciente adolescente (Lafora and Glueck, 1911) y que, posteriormente, se denominaron cuerpos de Lafora. Estas inclusiones citoplasmáticas son positivas a la tinción del ácido periódico de Schiff (*periodic acid-Schiff*, PAS) y están constituidas por polímeros similares al glucógeno, insolubles y pobremente ramificados (poliglucosanos) (Berkovic et al., 1986; Harriman et al., 1955; Lafora, 1911; Lafora and Glueck, 1911; Sakai et al., 1970; Yokoi et al., 1968).

Los cuerpos de Lafora se encuentran en distintos órganos y tejidos como piel, hígado, músculo, corazón y retina (Berkovic et al., 1993; Van Heycop Ten Ham, 1974) pero son más abundantes en aquellos órganos que presentan un metabolismo de glucosa elevado, como es el caso del cerebro, hígado, músculo esquelético y corazón (Van Heycop Ten Ham, 1974). El diagnóstico de la enfermedad, se realiza habitualmente a través de una biopsia cutánea axilar (Fig. 1) (Acharya et al., 1993; Carpenter and Karpatis, 1981).



**Figura 1. Imágenes de biopsia de piel humana con cuerpos de Lafora.** Los cuerpos de Lafora teñidos con tinción de PAS (flechas) se localizan en células mioepiteliales de glándulas apocrinas procedentes de piel de la axila de un paciente. Imágenes amablemente cedidas por el Dr. José Luis Sarasa, del Departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz.

En el sistema nervioso central, los cuerpos de Lafora se encuentran en el citoplasma neuronal sin membrana que los delimite (Cavanagh, 1999; Van Heycop Ten Ham, 1974). A menudo desplazan al núcleo al ocupar todo el citoplasma de la neurona y también ocupan el citoplasma de muchas dendritas, pero raramente se localizan en los axones (Cavanagh, 1999). Presentan un centro denso y una periferia menos densa tras la tinción de PAS y su rango de tamaño varía entre 3 y 40  $\mu\text{m}$ .

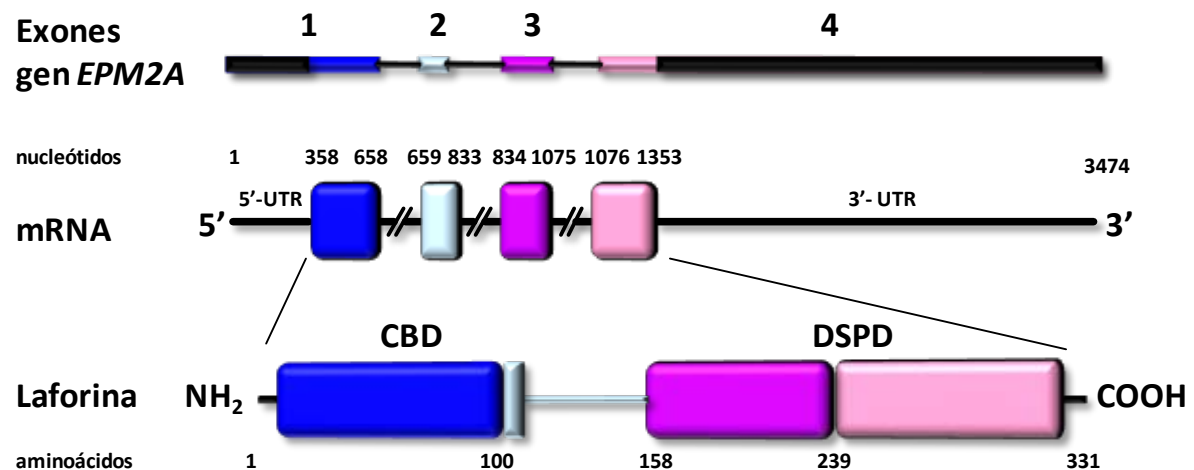
## 1.2. Genes implicados en la enfermedad de Lafora

Los análisis genéticos que se han realizado en familias de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Lafora han conducido a la identificación de numerosas mutaciones responsables de la aparición de casi el 90% de los casos de la enfermedad. Estas mutaciones se localizan en dos genes diferentes: *EPM2A* (*epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene A*) (Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999) y *NHLRC1/EPM2B* (*NHL repeat-containing protein 1/epilepsy of progressive myoclonus type 2 gene B*) (Chan et al., 2003b). Hasta la fecha se han descrito 124 mutaciones distintas y numerosos polimorfismos en estos genes (Ganesh et al., 2006; Gomez-Abad et al., 2005; Minassian et al., 1999; Serratosa et al., 1999; Singh et al., 2008; Singh et

al., 2005). Tanto los pacientes con mutaciones en el gen *EPM2A* como los pacientes con mutaciones en el gen *EPM2B* presentan manifestaciones clínicas similares. Sin embargo, los casos asociados al gen *EPM2A* parecen tener un desarrollo clínico más severo, siendo más lenta la progresión de la enfermedad en los pacientes con mutaciones en el gen *EPM2B* (Gomez-Abad et al., 2005). Además, se ha postulado la existencia de un tercer locus, aún desconocido, relacionado con la enfermedad de Lafora ya que aproximadamente un 10% de los pacientes diagnosticados no presentan mutaciones en ninguno de estos genes (Chan et al., 2004b).

### 1.2.1. Gen *EPM2A* y proteína laforina

El gen *EPM2A* (OMIM # [607566](#)) está localizado en el cromosoma 6q24, (Sainz et al., 1997; Serratosa et al., 1995) y se organiza en 4 exones que codifican la proteína laforina (Fig. 2). Este gen es responsable de cerca del 60% de los casos de la enfermedad de Lafora (Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999). Se trata de un gen altamente conservado (Gentry et al., 2007) que se expresa en todos los órganos y tejidos analizados: corazón, cerebro, músculo esquelético, hígado, pulmón, riñón, timo, ovarios, próstata, bazo, testículo, estómago, colon, páncreas, linfocitos y piel (Ganesh et al., 2001; Serratosa et al., 1999). En el caso del ratón, el gen *Epm2a* (NM\_010146.2) se localiza en el cromosoma 10 (localización 10A) y al igual que en humanos, también se organiza en cuatro exones (Ganesh et al., 1999).



**Figura 2. Estructura del gen *EPM2A* y de la proteína laforina.** La numeración de los nucleótidos corresponde a la secuencia de referencia del mRNA de laforina humana con número de acceso de *GenBank* NM\_005670.3. La región carboxilo-terminal de la proteína laforina presenta un dominio proteína fosfatasa de especificidad doble (DSPD) mientras que en la región amino-terminal, se encuentra



un dominio de unión a carbohidratos (CBD). Basado en (Singh and Ganesh, 2009) y en anotaciones de la base de datos de *Protein* de NCBI.

El gen *EPM2A* codifica cinco isoformas de la proteína laforina, de 331, 317, 224, 177 y 152 aminoácidos, que surgen por medio de un procesamiento alternativo del RNA (Dubey and Ganesh, 2008; Dubey et al., 2011; Minassian et al., 1998). Estas isoformas de laforina se localizan en el núcleo y/o en el citoplasma y dos de ellas presentan actividad fosfatasa. Pueden formar heterodímeros entre las isoformas activas y/o inactivas y así regular la actividad fosfatasa. Además, también regulan la actividad fosfatasa de laforina presentándose ellas mismas a la proteína malina para su degradación (Dubey et al., 2011). Así, gracias al procesamiento alternativo que da lugar a estas cinco isoformas de laforina, se modulan las propiedades funcionales de las mismas, además de establecer su localización subcelular (Dubey and Ganesh, 2008; Dubey et al., 2011; Ganesh et al., 2000; Ganesh et al., 2002c; Minassian, 2001).

Hasta la fecha se han descrito 63 mutaciones distintas y varios polimorfismos en el gen *EPM2A*. La mayor parte de las mutaciones se han localizado en el segmento común a las dos isoformas de la laforina descritas inicialmente, las isoformas de 331 y 317 aminoácidos, a lo largo de los 4 exones del gen *EPM2A* (Ianzano et al., 2004). Adicionalmente, el grupo de Singh (Singh et al., 2008) encontró una mutación que sólo afecta a la isoforma citoplasmática de 317 aminoácidos y que altera su localización subcelular. Entre las mutaciones descritas (Ianzano et al., 2005; Singh and Ganesh, 2009) se incluyen deleciones, inserciones, cambios de aminoácidos e introducción de codones de parada que dan lugar a formas truncadas de la proteína (base de datos de mutaciones y polimorfismos de la epilepsia mioclónica progresiva de Lafora: <http://projects.tcag.ca/lafora/>)

La región carboxilo-terminal de la proteína laforina presenta un dominio proteína fosfatasa de especificidad doble (DSPD, *Dual Specificity Phosphatase Domain*) fundamental para la función de la proteína laforina (Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999) y en la región amino-terminal, se encuentra un dominio de unión a carbohidratos (CBD, *Carbohydrate Binding Domain*) que promueve su unión a glucógeno (Fig. 2) (Gomez-Garre et al., 2000; Serratosa et al., 1999). Mediante estudios funcionales, se ha confirmado que la proteína laforina es capaz de desempeñar las dos funciones predichas en base a su secuencia, ya que es capaz de unir polisacáridos

Como veremos más adelante, la proteína laforina es también capaz de interaccionar con distintas proteínas celulares, entre ellas malina (Gentry et al., 2005), R5/PTG (*protein targeting to glycogen*) (Fernandez-Sanchez et al., 2003), la glucógeno sintasa (Worby et al., 2006), EPM2AIP1 (*EPM2A interacting protein 1*) (Ianzano et al., 2003) y HIRIP5 (*HIRA-interacting protein 5*) (Ganesh et al., 2003).

### 1.2.2. Gen *EPM2B* y proteína malina

**Exón**  
**gen *EPM2B***

nucleótidos 1 15 1202 2134

mRNA 5'-UTR 5' 3'-UTR 3'

**Malina** NH<sub>2</sub> RING Finger NHL NHL NHL NHL NHL COOH

aminoácidos 1 113 157 161 204 205 245 248 300 301 349 350 393 395

26

GenBank NM\_198586.2. Basado en (Singh and Ganesh, 2009) y en anotaciones de la base de datos de *Protein* de NCBI.

Hasta el momento se han descrito 61 mutaciones y varios polimorfismos en el gen *EPM2B* (Ianzano et al., 2005; Singh and Ganesh, 2009), que incluyen delecciones, inserciones que conducen a un cambio de fase, así como cambios de aminoácido e introducción de codones de parada (base de datos de mutaciones y polimorfismos de la epilepsia mioclónica progresiva de Lafora: <http://projects.tcag.ca/lafora/>).

La proteína malina es una proteína ligasa de ubiquitina E3 de 395 aminoácidos. Presenta un dominio RING (*Really Interesting New Group of Proteins*) *finger* (un tipo específico de dedo de cinc, *zinc finger*) característico de una clase de ligasas de ubiquitina E3 (Freemont, 2000; Pickart, 2001). La actividad ligasa de ubiquitina E3 ha sido confirmada posteriormente a la secuenciación del gen (Gentry et al., 2005; Lohi et al., 2005a). Malina es capaz de autoubiquitinarse al ser sobre-expresada en células y de ubiquitinar sustratos como la laforina, la glucógeno sintasa, la enzima ramificante del glucógeno y la PTG, induciendo su degradación (Cheng et al., 2007; Gentry et al., 2005; Lohi et al., 2005a; Solaz-Fuster et al., 2008; Vilchez et al., 2007; Worby et al., 2008). Además, malina contiene seis dominios repetidos NHL en la región carboxilo-terminal (descritos por primera vez en las proteínas Ncl-1, HT2A y Lin-41) (Slack and Ruvkun, 1998) implicados en la interacción proteína-proteína, que le permiten interaccionar también con laforina (Chan et al., 2003b; Gentry et al., 2005; Pickart, 2001; Solaz-Fuster et al., 2008). En el caso de ratón, la proteína malina (NP\_780549.1) consta de 401 aminoácidos y presenta una homología de secuencia del 82% con la proteína humana (NP\_940988.2).

### **1.3. Interacción laforina-malina**

A partir del descubrimiento de los genes y de las mutaciones responsables de la aparición de la enfermedad de Lafora, diferentes laboratorios han intentado identificar las dianas fisiológicas del complejo laforina-malina para determinar las bases moleculares de la enfermedad. Así, se ha descrito que una de las funciones críticas de la malina consistiría en regular los niveles intracelulares de la laforina. Gracias a la actividad ubiquitina ligasa de malina, su interacción con laforina produciría la ubiquitinización y posterior degradación de la misma vía proteasoma (Gentry et al., 2005). Además, se ha observado que la interacción directa de las dos proteínas en el

complejo laforina-malina induce la degradación de ciertas enzimas relacionadas con la síntesis del glucógeno, aumenta la eliminación de proteínas celulares plegadas incorrectamente y protege de la toxicidad inducida por estrés, como veremos a continuación.

#### **1.4. Metabolismo del glucógeno y enfermedad de Lafora**

La formación de los agregados de poliglucosanos que forman los cuerpos de Lafora en diferentes tejidos de los pacientes con esta enfermedad ha sugerido la existencia de una ruta bioquímica relacionada con el metabolismo del glucógeno que pudiera estar implicada en la etiología de la enfermedad. En condiciones normales, las neuronas no acumulan glucógeno pero, sin embargo, presentan todas las enzimas encargadas del metabolismo del mismo. Es posible que los cuerpos de Lafora se originen por un defecto en el metabolismo del glucógeno, ya que no hay otra fuente de polímeros de glucosa en los tejidos animales (Berkovic et al., 1993; Busard et al., 1986; Cavanagh, 1999; Minassian et al., 2000; Sakai et al., 1970) y tanto laforina como malina ejercerían una regulación negativa sobre su metabolismo (Solaz-Fuster et al., 2008).

Las enzimas encargadas de la síntesis de glucógeno son la glucógeno sintasa (GS) y la enzima ramificante de glucógeno (GBE), mientras que la degradación del glucógeno se lleva a cabo gracias a la acción de dos enzimas, la glucógeno fosforilasa (GP) y la enzima desramificante de glucógeno (GDE) (Roach, 2002). La proteína fosfatasa tipo 1 (PP1) activa por desfosforilación a la GS e inactiva a la GP. La subunidad reguladora de la PP1, la PTG, que conduce a la PP1 al glucógeno, funciona como un “andamio” molecular posicionando a las enzimas PP1, GS y GP cercanas en el espacio al glucógeno y produciendo un incremento de la síntesis del mismo (Gasa et al., 2000; Lerin et al., 2003; Yang et al., 2002).

##### **1.4.1. Las proteínas laforina y malina y los cuerpos de Lafora**

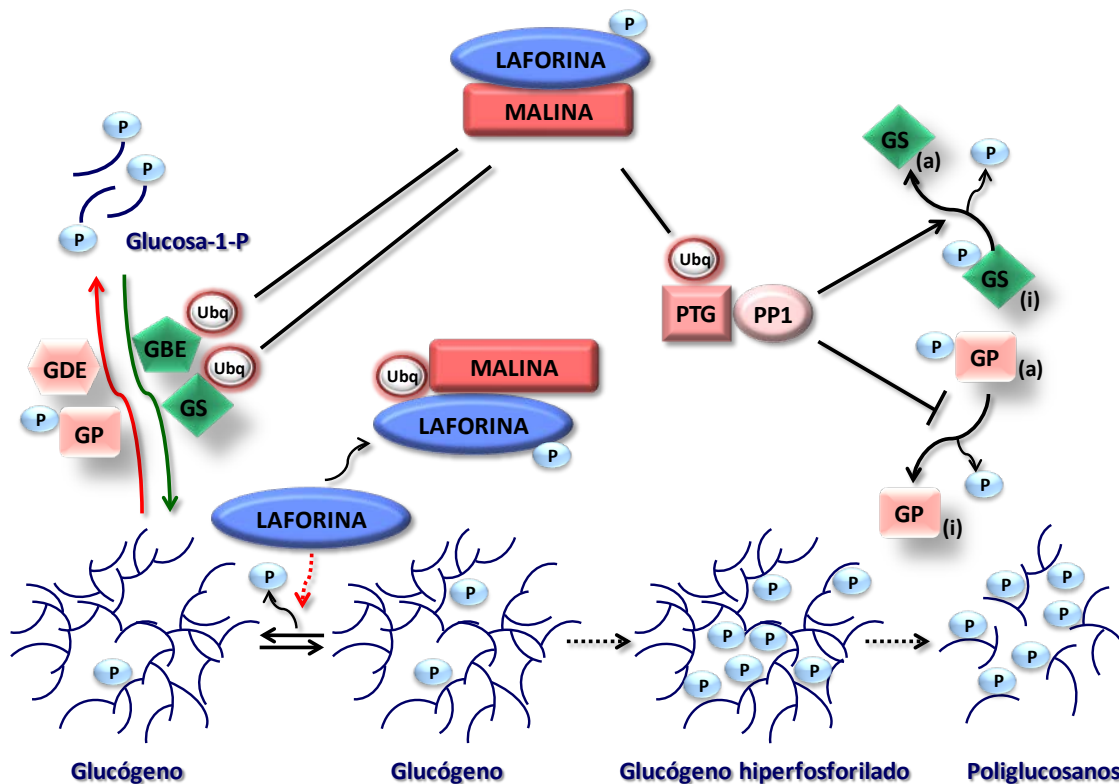
Se ha observado que el complejo laforina-malina induce la degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma de PTG, la subunidad reguladora de PP1, y de GS y GBE, enzimas necesarias para la síntesis de glucógeno (Fig. 4) (Cheng et al., 2007; Gentry et al., 2005; Lohi et al., 2005a; Solaz-Fuster et al., 2008; Vilchez et al., 2007; Worby et al., 2008). En ratones dobles mutantes deficientes para la expresión de

laforina y de PTG (Turnbull et al., 2011) se ha visto que la ausencia de PTG revierte los efectos producidos por la ausencia de laforina, ya que no aparecen los cuerpos de Lafora ni las alteraciones neurológicas presentes en los ratones nulos para la expresión de laforina (ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>, ver apartado 2.2.1) (Ganesh et al., 2002a) reforzando la idea de que el complejo laforina-malina interviene en la degradación de PTG.

Por otro lado, se ha visto que la laforina actúa como una glucógeno fosfatasa (Gentry et al., 2007; Tagliabracci et al., 2008; Tagliabracci et al., 2007; Worby et al., 2006) por lo que se ha sugerido que podría estar suprimiendo la fosforilación excesiva del glucógeno. De esta manera la laforina podría prevenir la formación de glucógeno hiperfosforilado, pobremente ramificado y propenso a agregarse en los polímeros similares al glucógeno que formarían los cuerpos de Lafora (Fig. 4) (Gentry et al., 2007; Tagliabracci et al., 2008; Tagliabracci et al., 2007; Worby et al., 2006). Así, la pérdida de función de la proteína laforina podría producir un aumento de la síntesis de glucógeno y una hiperfosforilación de polímeros de glucógeno que conduciría a la acumulación de poliglucosanos en los cuerpos de Lafora.

Por otro lado, se ha descrito que el complejo laforina-malina aumenta la eliminación de proteínas celulares plegadas incorrectamente a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Garyali et al., 2009). Adicionalmente, se ha observado que este complejo protege de la toxicidad inducida por estrés activando al factor de choque térmico 1 (*heat-shock factor 1*, HSF1) y aumentando la expresión de proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*, HSPs) (Sengupta et al., 2011). Además, muy recientemente se ha identificado a la neuronatina, un miembro de las proteínas de membrana de la familia de los proteolípidos que estimula la glucogénesis, como un nuevo sustrato de malina (Sharma et al., 2011).

Aunque la causa de la aparición de los cuerpos de Lafora así como su contribución a la etiología de la enfermedad son todavía motivo de controversia, parece que el complejo laforina-malina estaría regulando el metabolismo del glucógeno, de modo que la falta de laforina o malina podría conducir a la formación de los cuerpos de Lafora y colaborar en la patogénesis de la enfermedad.



**Figura 4. Hipótesis de la regulación del metabolismo de glucógeno por laforina y malina.** El complejo laforina-malina produciría la degradación de GS, de GBE y de PTG a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Solaz-Fuster et al., 2008; Vilchez et al., 2007; Worby et al., 2006). La degradación de PTG previene la activación de GS y la inactivación de GP mediada por PP1, manteniendo así la ruta de gluconeogénesis desactivada. Por otro lado, la proteína laforina podría regular la fosforilación normal del glucógeno a través de su actividad fosfatasa evitando la formación de glucógeno hiperfosforilado y de poliglucosanos, y siendo posteriormente degradada por el complejo laforina-malina a través del sistema ubiquitina. La ausencia de laforina y de malina produciría la activación de la síntesis de glucógeno y la acumulación de los poliglucosanos en los cuerpos de Lafora. PTG (*protein targeting to glycogen*, subunidad reguladora que dirige PP1 al glucógeno), GBD (enzima ramificante del glucógeno), GDE (enzima desramificante del glucógeno), GS (glucógeno sintasa), GP (glucógeno fosforilasa), PP1 (proteína fosfatasa 1), Ubq (ubiquitina).

#### 1.4.2. Las proteínas laforina y malina en la autofagia

La autofagia es un proceso que las células utilizan para degradar proteínas intracitoplasmáticas, oligómeros proteicos, orgánulos y ciertos patógenos intracelulares (García-Arencibia et al., 2010; Klionsky et al., 2007; Knecht et al., 2009; Ravikumar et al., 2009). Se inicia cuando las células forman una vesícula de doble membrana, el llamado autofagosoma, alrededor de una porción de citoplasma. Los autofagosomas son transportados a los lisosomas, con los que finalmente se fusionan, permitiendo que sus

componentes sean degradados por las hidrolasas lisosomales. La autofagia es una ruta importante de degradación intracelular de glucógeno (Kotoulas et al., 2006; Shea and Raben, 2009).

La proteína laforina es un regulador positivo de la autofagia, a través de la ruta de la quinasa de mamíferos diana de rapamicina (mTOR). En modelos animales de la enfermedad de Lafora se ha visto que la ausencia de laforina produce la inhibición de la formación de autofagosomas (Aguado et al., 2010). Así, se ha postulado que las inclusiones poliglucosanos podrían ser sustratos de autofagia, por lo que la falta de laforina podría impedir su secuestro en autofagosomas llevando a su agregación y acumulación en los cuerpos de Lafora (Puri and Ganesh, 2010). Igualmente, se ha observado que la ausencia de malina provoca alteraciones en la autofagia, también debido a que se encuentra alterada la formación de los autofagosomas (Criado et al., 2011). Por todo ello, se ha establecido que existe una relación entre los defectos de autofagia producidos por la ausencia de laforina y de malina y el desarrollo de la enfermedad de Lafora.

## **2. Modelos animales para el estudio de epilepsias**

Existen numerosos modelos animales de epilepsias con crisis epilépticas inducidas mediante la administración de fármacos o agentes químicos epileptógenos, modelos específicos de diferentes tipos de epilepsias generados mediante manipulación genética en ratones, así como un modelo canino espontáneo natural de la enfermedad de Lafora.

### **2.1. Modelos farmacológicos para el estudio de las epilepsias**

Los principales modelos animales de crisis epilépticas generalizadas inducidas se han generado mediante la administración sistémica o la aplicación focal de agentes químicos (Fisher, 1989). Las principales drogas convulsionantes que se emplean para la producción de crisis generalizadas agudas pueden afectar a la transmisión inhibitoria mediada por GABA o por glicina, como el pentilenetetrazol (PTZ) (Reinhard and Reinhard, 1977; Swinyard, 1989; Verdinakis, 1969; Vernadakis and Woodbury, 1969), la bicuculina (Ben-Ari et al., 1981a) o la picrotoxina (Mackenzie et al., 2002), a la transmisión de aminoácidos excitatorios, como el ácido kaínico (Ben-Ari et al., 1981b;

Zaczek et al., 1981) o actuar sobre los receptores de acetilcolina como la pilocarpina (Turski et al., 1983). También se pueden producir crisis focales agudas mediante la administración de sustancias epileptógenas dentro de regiones sensitivas del cerebro (neocórtex o hipocampo). Dentro de este grupo de sustancias, se encuentran los metales cobalto, zinc, antimonio y hierro (Colasanti and Craig, 1992; Fisher, 1989; Pei and Koyama, 1986), las drogas convulsionantes, como las mencionadas previamente (Campbell and Holmes, 1984), o los antibióticos como la penicilina (Velisek and Moshé, 2000) y la cefalosporina (Kamei et al., 1983).

El bloqueo farmacológico del receptor GABA<sub>A</sub> (receptor del ácido -aminobutírico, GABA, tipo A) se ha usado extensamente para estudiar la actividad epileptiforme en animales de experimentación. El PTZ es un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub> (Stone, 1970) y se utiliza como modelo farmacológico de crisis generalizadas. A dosis bajas en animales de experimentación induce ausencias similares a las crisis de ausencia descritas en algunos pacientes con epilepsia, de igual manera que todos los antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> (Snead et al., 2000) mientras que dosis de 50 mg/kg de PTZ producen crisis tónico-clónicas en el 50% de los ratones control (Eloqayli et al., 2003; Erakovic et al., 2001).

Originalmente, el PTZ se empleó como un cardioestimulante. En la actualidad, el PTZ se usa como agente convulsionante en ratones, ratas y monos (Reinhard and Reinhard, 1977; Swinyard, 1989; Verdinakis, 1969; Vernadakis and Woodbury, 1969). El PTZ induce crisis tónico-clónicas (Coimbra et al., 2001a; Coimbra et al., 2001b; Panagopoulos et al., 1998; Woodbury et al., 1980) y se usa como test de rutina para probar distintos agentes antiepilépticos (Swinyard, 1989). Las crisis epilépticas se desarrollan dentro de los 20 min tras la inyección. Normalmente, el comportamiento que se observa tras la administración de PTZ es (1) inmovilidad o *freezing*, (2) sacudidas musculares, (3) crisis tónica y (4) crisis tónico-clónica (Pitkanen A., 2006).

## **2.2. Modelos animales de la enfermedad de Lafora**

En la actualidad existen diferentes modelos de ratón generados por manipulación genética de los genes *Epm2a* y *Epm2b*. Además, también se han generado ratones transgénicos sobre-expresando el gen de laforina mutado.



### 2.2.1. Modelos de ratón con alteraciones en la expresión de la proteína laforina

Se han generado dos modelos de ratón de la enfermedad de Lafora mediante la alteración de la expresión del gen *Epm2a* (Chan et al., 2004a; Ganesh et al., 2002a). El primero de ellos comprende una línea de ratones nulos para la expresión del gen *Epm2a* (ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>) generada mediante la eliminación del cuarto exón del gen, que codifica el dominio fosfatasa de especificidad doble, fundamental para la función de la proteína laforina (Ganesh et al., 2002a). Estos ratones nulos para la expresión de laforina son viables y presentan muchos, aunque no todos los factores de la enfermedad humana. Estudios previos han sugerido que estos ratones presentan un desarrollo completamente normal y son fértiles, pero desarrollan alteraciones de comportamiento a los 4 meses y signos de ataxia y epilepsia mioclónica a los 9 meses de edad. También se han observado inclusiones de Lafora en estos ratones, similares a los cuerpos de Lafora descritos en pacientes, neurodegeneración, actividad epileptiforme y respuestas deterioradas en ciertos test de comportamiento (Ganesh et al., 2002a). Los cuerpos de Lafora en los ratones afectados aumentan de tamaño y número con la edad y también presentan ubiquitina (Ganesh et al., 2002a). Las regiones más afectadas incluyen el hipocampo, cerebelo, corteza cerebral, tálamo y núcleos motores del troncoencéfalo, correspondientes a las zonas donde se expresa mayoritariamente la laforina humana (Ganesh et al., 2001; Ganesh et al., 2002a). De forma similar a lo que ocurre en pacientes con enfermedad de Lafora, en ratones de 9 meses nulos para la expresión de laforina, se encontraron cuerpos de Lafora en músculo esquelético e hígado, los cuales no se hallaron en ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 4 meses de edad (Ganesh et al., 2002a). Además, a todas las edades analizadas, los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> presentan signos de neurodegeneración, las neuronas muestran oscurecimiento celular, condensación nuclear y citoplásmica, hinchazón de orgánulos subcelulares y anomalías estructurales en los procesos neuronales. Sin embargo, no se encuentran las características que definen los procesos apoptóticos ni aparece fragmentación del DNA, sugiriéndose que la muerte celular ocurre sin activación de apoptosis. Estos procesos de neurodegeneración aparecen antes que los cuerpos de Lafora, precediendo asimismo a los síntomas de la enfermedad (Ganesh et al., 2002a).

El segundo modelo experimental descrito es un ratón transgénico dominante negativo que sobre-expresa la proteína laforina con la mutación C266S en el DSPD (Chan et al., 2004a). Los ratones no presentan crisis clínicas o electroencefalográficas ni signos de neurodegeneración pero, sin embargo, sí desarrollan cuerpos de Lafora en neuronas, músculo e hígado. A diferencia de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>, estos ratones presentan una gran formación de cuerpos de Lafora en el hipocampo con una escasa distribución en el resto del cerebro. También presentan cuerpos de Lafora en hepatocitos y miocitos.

En este trabajo se presenta una extensa caracterización funcional de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> citados anteriormente (Ganesh et al., 2002a), así como un profundo estudio de la actividad electroencefalográfica en condiciones basales y en respuesta al agente epileptógeno PTZ.

### **2.2.2. Modelos de ratón con alteraciones en la expresión de la proteína malina**

Se han generado cuatro modelos de ratón de la enfermedad de Lafora mediante alteración en el gen *Epm2b* (Criado et al., 2011; DePaoli-Roach et al., 2010; Turnbull et al., 2010; Valles-Ortega et al., 2011). El primero de ellos (DePaoli-Roach et al., 2010) es una línea de ratones nulos para la expresión del gen *Epm2b* generada mediante eliminación del único exón del gen *Epm2b*. Estos ratones son viables pero desarrollan cuerpos de Lafora a partir de los tres meses de edad, que son abundantes en cerebelo, hipocampo y corteza cerebral y en menor cantidad en músculo cardíaco y esquelético, estando ausentes en hígado. El segundo modelo (Turnbull et al., 2010) es también una línea de ratones nulos para la expresión del gen *Epm2b*, igualmente generada mediante eliminación del único exón del gen. Estos ratones muestran un desarrollo normal y son fértiles pero desarrollan cuerpos de Lafora a los 6 meses de edad en músculo esquelético, hígado y en corteza cerebral y cerebelo. No se han descrito alteraciones neurológicas ni de comportamiento en ninguno de los dos modelos de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> a las edades analizadas (3-6 meses) (DePaoli-Roach et al., 2010; Turnbull et al., 2010).

El tercer modelo es una línea de ratones nulos para la expresión del gen *Epm2b* (Valles-Ortega et al., 2011) en la que el único exón del gen es sustituido por el gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Estos ratones tienen un desarrollo normal y son fértiles y presentan

cuerpos de Lafora en muchas áreas del cerebro, siendo muy abundantes en el hipocampo y en el cerebelo, en músculo esquelético y en corazón. En cerebro, los autores destacan también la presencia de estas inclusiones en astrocitos. A los 11 meses de edad, estos ratones presentan neurodegeneración, excitabilidad sináptica aumentada, así como niveles incrementados de la enzima GS en cerebro y presentan cierta propensión a sufrir crisis mioclónicas después de recibir estímulos epileptógenos. Observan un aumento en la enzima glucógeno sintasa en estos ratones, la cual se acumula en los cuerpos de Lafora.

En este trabajo se muestran los experimentos realizados para caracterizar un nuevo modelo de ratón deficiente para la expresión de malina, generado mediante la escisión del único exón del gen *Epm2b*. Estos ratones manifiestan alteraciones neurológicas y de comportamiento a partir de los 4-8 meses de edad que se correlacionan con una autofagia alterada y la presencia de numerosos cuerpos de Lafora en corteza cerebral y cerebelo (Criado et al., 2011).

### **2.2.3. Modelo canino de la enfermedad de Lafora**

Además de estos modelos de ratón, existe un modelo animal de la enfermedad de Lafora en perros de la raza Teckel miniatura de pelo duro, causado por repeticiones expandidas de un dodecámero presente en la región codificante del gen *Epm2b*, que produce un fenotipo muy similar a la enfermedad de Lafora en pacientes (Lohi et al., 2005b). La enfermedad se manifiesta entre los 6 y los 9 años de edad. Los perros afectados son física y neurológicamente normales excepto por la presencia de epilepsia mioclónica progresiva que puede desencadenarse por estímulos auditivos o visuales (Webb et al., 2009). En estados avanzados, los animales pueden presentar ataxia o ceguera y un aumento en la frecuencia de crisis fármaco-resistentes.

## **3. Otras enfermedades neurológicas con epilepsia. Demencias y tauopatías**

Existen numerosas enfermedades neurológicas que presentan un cuadro clínico complejo al que se asocian mioclonías y epilepsia. Entre ellas se encuentran ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la enfermedad de Wilson y ciertos

casos de demencias y tauopatías. Las tauopatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas cuya característica fundamental es la presencia de lesiones neurofibrilares compuestas por agregados de la proteína tau hiperfosforilada en células del sistema nervioso central, como veremos en el apartado siguiente (3.1). La demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17), la degeneración corticobasal (DCB), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la enfermedad de Alzheimer son algunas de las tauopatías más ampliamente descritas. En los enfermos con demencias y tauopatías no son frecuentes las crisis epilépticas pero, sin embargo, sí son más frecuentes que en la población general.

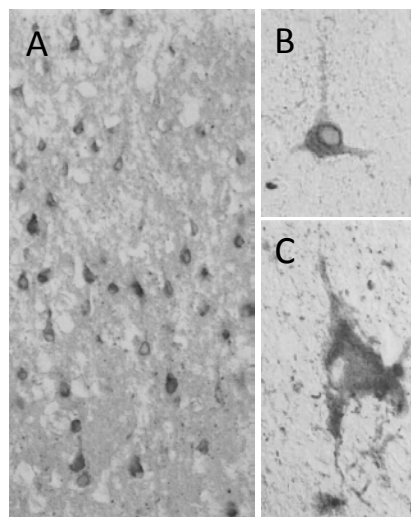
Las demencias frontotemporales (FTDs) representan una forma rara de demencias preseniles que se definen clínicamente por cambios de comportamiento y de personalidad, por estereotipos psicomotores, desinhibición, problemas de lenguaje, pérdida del juicio y de la comprensión (Groups, 1994) y, en algunos pacientes, por la asociación con parkinsonismo, como en la FTDP-17 (Foster et al., 1997; Goedert, 2004; Sperfeld et al., 1999; Spillantini et al., 1998). Por otro lado, la enfermedad de Alzheimer es la causa más frecuente de demencia en edades avanzadas. Es una enfermedad progresiva e incurable cuyos síntomas característicos son la pérdida de funciones superiores que afectan a la resolución de problemas (toma de decisiones, juicio, orientación espacial y de cálculo) a la pérdida de personalidad y de memoria, a las alteraciones de orientación y de lenguaje, al deterioro intelectual progresivo y en estadios terminales, a la pérdida de capacidad motora (Adams and Victor, 1993; Damasio, 1989). Los análisis neuropatológicos muestran una clara atrofia en la región del hipocampo y en las áreas asociativas corticales.

De acuerdo con los criterios diagnósticos de las FTDs, la presencia de crisis epilépticas es un acontecimiento poco frecuente (Foster et al., 1997; Rascovsky et al., 2011). Por otro lado, se han descrito ciertos casos de pacientes con DCB (Douglas et al., 2009) y PSP (Filla et al., 2002; Klimek et al., 1998; Kofler et al., 2000; Nygaard et al., 1989) que presentaban cuadros clínicos de epilepsia. Además, la enfermedad de Alzheimer también está asociada con una mayor incidencia de crisis espontáneas, siendo el diagnóstico de la enfermedad a edades tempranas un factor de riesgo para la aparición de crisis epilépticas (Amatniek et al., 2006; Hauser et al., 1986; Mendez et al., 1994; Risse et al., 1990; Romanelli et al., 1990; Scarmeas et al., 2009).

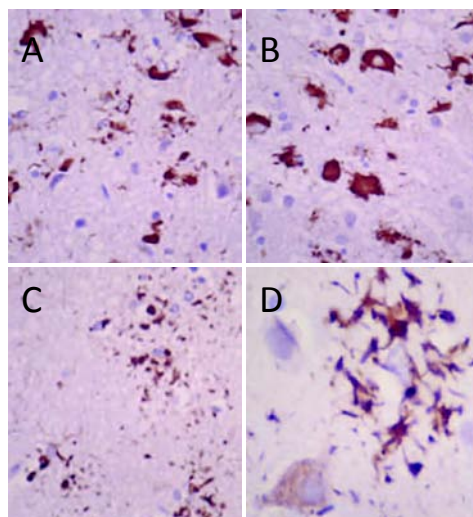
Por otra parte, ciertas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y algunos tipos de demencia, entre ellos la enfermedad de Alzheimer, se desarrollan más frecuentemente en pacientes con epilepsia. Además, la aparición de epilepsia en edades avanzadas produce, a veces, un deterioro cognitivo que se puede diagnosticar de forma errónea como una demencia progresiva.

### **3.1. Rasgos neuropatológicos de demencias y tauopatías. FTDP-17 y enfermedad de Alzheimer**

Las características neuropatológicas más destacadas de las FTDs son la presencia de atrofia frontotemporal asimétrica y atrofia de los ganglios basales y de la sustancia *nigra*. En los pacientes con FTDP-17 aparecen depósitos de neurofilamentos helicoidales apareados (*paired helical filaments*, PHFs) y filamentos rectos (*straight filaments*, SF), compuestos por la proteína tau hiperfosforilada, en neuronas (Fig. 5) y células gliales (Fig. 6) de ciertas regiones del sistema nervioso (Bugiani et al., 1999; Foster et al., 1997; Yamaoka et al., 1996). La proteína tau es una proteína asociada a microtúbulos (Weingarten et al., 1975) que, en situaciones patológicas, se encuentra hiperfosforilada (Arrasate et al., 1999; Feany and Dickson, 1996; Goedert et al., 1992; Iqbal et al., 2009; Perez et al., 2002) mostrando una menor afinidad por los microtúbulos y una mayor capacidad de auto-ensamblaje (Schneider et al., 1999).



**Figura 5. Estructuras neuropatológicas características de la FTDP-17 con el anticuerpo AT8 en corteza cerebral.** En todas las capas corticales se observan abundantes neuronas con agregados de la proteína tau identificados con el anticuerpo AT8 (A). Estos agregados pueden estar más concentrados alrededor del núcleo (B) o junto a la membrana plasmática (C). Modificado de (Bugiani et al., 1999).



**Figura 6. Astrocitos reactivos en corteza cerebral del cerebro de un paciente con FTDP-17, identificados con un anticuerpo dirigido contra la proteína tau fosforilada en Ser396.** Se observan abundantes grupos de astrocitos reactivos (*tufted astrocytes*) (A y B) y placas de astrocitos (C y D). Modificado de (Zarranz et al., 2005).

Los cerebros de enfermos de Alzheimer presentan dos estructuras anómalas características (Fig. 7): las placas seniles, agregados extracelulares del péptido - amiloide ( $\beta$ A) rodeados de microglía activada, astrocitos reactivos y neuritas distróficas (Maccioni et al., 2001; Masters et al., 1985; Selkoe, 2001) y los ovillos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles*, NFTs), agregados de neurofilamentos helicoidales apareados (PHFs) compuestos por la proteína tau hiperfosforilada (Avila et al., 2004; Bramblett et al., 1993; Brion et al., 1993; Goedert et al., 1993; Grundke-Iqbal et al., 1986a; Grundke-Iqbal et al., 1986b; Mandelkow and Mandelkow, 1998). En la enfermedad de Alzheimer, los agregados de la proteína tau hiperfosforilada se localizan primeramente en el hipocampo, corteza entorrinal y amígdala. Estas áreas cerebrales se encuentran, además, notablemente afectadas por la pérdida de neuronas y de sinapsis, hecho por el cual se producen los déficits cognitivos característicos de la enfermedad (Arendt et al., 1983; Gomez-Isla et al., 1996; Scott et al., 1992; West et al., 1994).



**Figura 7. Estructuras neuropatológicas características de la enfermedad de Alzheimer con tinción de Gallyas-Bielschowsky.** Las placas seniles son agregados extracelulares compuestos del péptido  $\beta$ -amiloide rodeados de microglía, astrocitos reactivos y neuritas distróficas (flecha). Los ovillos neurofibrilares (*tangles*, NFTs) están compuestos por filamentos apareados enrollados en espiral (PHFs) formados por la proteína tau hiperfosforilada (flecha abierta).

### 3.2. Genética de las demencias y tauopatías

Las FTDs aparecen típicamente como enfermedades aparentemente esporádicas; sin embargo, los casos de FTD que se heredan con carácter autosómico dominante van frecuentemente acompañados de déficits clínicos adicionales de parkinsonismo, como en la FTDP-17. Se han descrito numerosas mutaciones intrónicas y de introducción de codones de parada en el gen *TAU* que dan lugar a formas truncadas de la proteína, en familias con FTDP-17 (Goedert, 2004; Hutton et al., 1998).

Por el contrario, el 80-95% de los casos de enfermedad de Alzheimer son de origen desconocido. Sólo en el 5-20% de los mismos existen antecedentes familiares de la enfermedad y, normalmente, son formas de inicio temprano debidas a mutaciones autosómicas dominantes. Hasta el momento, las únicas mutaciones identificadas en casos de pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar se localizan en el gen que codifica la proteína precursora del amiloide (*APP*), el gen de la presenilina 1 (*PSEN1*) y el de la presenilina 2 (*PSEN2*) (ver base de datos de mutaciones de enfermedad de Alzheimer/Demencia frontotemporal, AD/FTD <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>).

En pacientes con enfermedad de Alzheimer no se han encontrado mutaciones ni polimorfismos en el gen que codifica la proteína tau. Sin embargo, aparte de las múltiples mutaciones descritas en la FTDP-17, también se han descrito polimorfismos

en el gen *TAU* en otras tauopatías, como en la PSP y en la DCB. Hasta el momento, todas las mutaciones que se han encontrado en pacientes con enfermedad de Alzheimer que presentan crisis epilépticas se localizan en los genes responsables de los casos de Alzheimer familiar, todos ellos relacionados con el procesamiento del APP y la formación del  $\beta$ -amiloide (Noebels, 2011). También se han encontrado algunos casos de FTDP-17 y de DCB que presentan crisis epilépticas, portando mutaciones en el gen que codifica la proteína tau (Filla et al., 2002; Hesdorffer et al., 1996; Sperfeld et al., 1999).

#### **4. Modelos animales de demencias y tauopatías. FTDP-17 y enfermedad de Alzheimer**

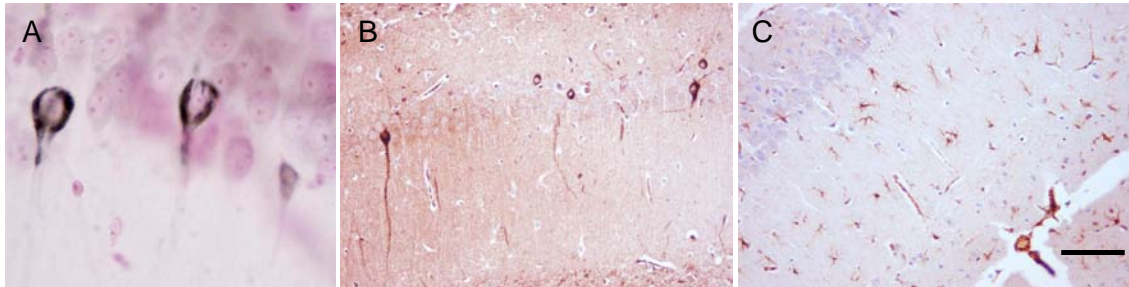
Se han generado numerosos modelos animales de demencias y tauopatías, tanto transgénicos como nulos para la expresión de diversas proteínas relacionadas, principalmente los modelos de la enfermedad de Alzheimer y de FTDP-17. Entre estos modelos, se encuentran los ratones transgénicos que sobre-expresan formas salvajes o mutadas de APP/ $\beta$ A, Psen1 y Psen2, ApoE, GSK3 $\beta$  y Tau, los ratones nulos para la expresión de APP, Psen1 y Psen2, ApoE, ~~GSK3~~ Tau ~~íax~~ como los ratones transgénicos con combinaciones de estas mutaciones. Ninguno de estos modelos presenta un fenotipo completo de la enfermedad de Alzheimer ni de la FTDP-17. Sólo el triple mutante 3xTg-AD (betaAPPSwe X PS1M146V X tauP301L) (Oddo et al., 2003) muestra un fenotipo similar al que presentan los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, con placas de  $\beta$ -amiloide, agregados de tau, pérdida de función sináptica y astrogliosis, neurodegeneración y muerte celular, y alteraciones de conducta propias de la enfermedad.

##### **4.1. Modelo transgénico de la proteína tau humana con mutaciones de FTDP-17**

En este trabajo se ha analizado un modelo experimental transgénico de la proteína tau humana con dos insertos en la región amino-terminal y cuatro repeticiones en el dominio de unión a tubulina, y con las mutaciones G272V, P301L y R406W, características de la FTDP-17, bajo el control del promotor específico neuronal Thy-1 (ratones *Tau*<sup>VLW</sup>) (Lim et al., 2001). Estos ratones presentan alteraciones en el comportamiento motor y déficits de memoria que se agravan con la edad (Navarro et al., 2008a; Navarro et al., 2008b). En corteza cerebral e hipocampo se observan agregados



de la proteína tau hiperfosforilada con tinción de plata (Fig. 8 A) y con anticuerpos contra agregados de tau hiperfosforilada (PHF1) (Fig. 8B). También aparece gliosis reactiva con el anticuerpo GFAP (Fig. 8C) (Guerrero et al., 2008; Guerrero et al., 2009) pero no presentan agregados del péptido  $\beta$ -amiloide en cerebro (Perez et al., 2005).



**Figura 8. Región CA1 de hipocampo de ratones *Tau<sup>VZW</sup>* de 18 meses mostrando agregados de tau y gliosis reactiva.** Ovillos neurofibrilares observados con la tinción de plata Gallyas-Braak (A). Tinción inmunohistoquímica de agregados de tau hiperfosforilado en neuronas piramidales de hipocampo con el anticuerpo PHF1 (B). Astrocitos reactivos identificados con el anticuerpo GFAP (C). La barra corresponde a 22  $\mu$ m en (A) y a 124  $\mu$ m en (B) y (C).

## 4.2. Epilepsia en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer

Todos los modelos animales de la enfermedad de Alzheimer apoyan la hipótesis de la cascada del amiloide y demuestran la función fundamental que tiene la proteína tau en la toxicidad del  $\beta$ -amiloide. Estudios electroencefalográficos de ratones transgénicos de *APP* revelaron la presencia de descargas epileptiformes intermitentes sincronas corticales e hipocampales y crisis generalizadas no convulsivas (Minkeviciene et al., 2009; Palop et al., 2007; Vogt et al., 2009; Westmark et al., 2008). Estas alteraciones parecen estar asociadas con una importante remodelación de los circuitos inhibitorios, con un incremento de la inhibición sináptica y con defectos en la plasticidad sináptica del giro dentado (Palop et al., 2007). Así, se ha sugerido que la sobre-expresión de APP/ $\beta$ A induce una actividad aberrante de redes neuronales excitatorias *in vivo*, que dispara mecanismos inhibitorios compensatorios en circuitos hipocampales. Ambos, la actividad excitatoria neuronal aberrante y los mecanismos inhibitorios compensatorios, podrían limitar la capacidad de plasticidad sináptica y contribuir a la disfunción de las redes neuronales relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (Palop et al., 2007). Por otro lado, se ha observado que las modificaciones que evitan la aparición de crisis epilépticas en estos modelos de APP/también

previenen los déficits cognitivos, indicando que los factores responsables de ambos procesos son comunes (Palop and Mucke, 2010). En los modelos transgénicos de APP/ $\beta$ A, los altos niveles de  $\beta$ -amiloide son suficientes para producir epilepsia en ausencia de neurodegeneración y de muerte neuronal, pero este efecto no tiene lugar en ausencia de la proteína tau normal (Palop and Mucke, 2009). Sin embargo, hasta la fecha no se habían descrito estudios de actividad epileptiforme en ratones con modificaciones del gen que codifica la proteína tau.

En este trabajo se presenta el estudio electroencefalográfico de base de un modelo de FTDP-17, los ratones *Tau*<sup>VLW</sup>, que muestra la presencia de actividad epileptiforme con mioclonías aisladas correspondientes a sacudidas musculares, así como crisis generalizadas tónico-clónicas, con o sin manifestación externa de actividad convulsiva. Estos ratones también muestran un umbral de resistencia a PTZ muy inferior a los ratones control. Estos resultados indican que sólo la presencia de agregados anómalos de tau, sin la existencia de agregados del péptido  $\beta$ -amiloide, produce una alteración funcional que conduce a la aparición de actividad epileptiforme y crisis epilépticas.

## **5. Estudios de registros electroencefalográficos con vídeos monitorizados simultáneos**

La electroencefalografía es una exploración neurofisiológica que se basa en el registro de la actividad bioeléctrica cerebral, resultado de la suma espacial y temporal de los potenciales postsinápticos procedentes de las neuronas piramidales orientadas verticalmente en la corteza cerebral (Schaul, 1998). El electroencefalograma (EEG) proporciona una representación gráfica en el tiempo de la distribución de las diferencias de potencial eléctrico entre los electrodos colocados sobre las distintas zonas del cuero cabelludo. La actividad electroencefalográfica se divide, según la frecuencia de los potenciales, en cuatro grupos que se denominan con letras griegas: alfa (8 a 13 ciclos por segundo o Hz), beta (más de 13 Hz), theta (4 a 7 Hz) y delta (menos de 4 Hz) (Fisch, 1999).

La monitorización de la actividad electroencefalográfica con registro de vídeo simultáneo (vídeo-EEG) es una técnica que permite documentar simultáneamente el comportamiento del paciente y el registro del EEG durante periodos prolongados. Es la

principal herramienta diagnóstica para la epilepsia y un elemento clave para la clasificación de las crisis epilépticas (Velis et al., 2007). Las descargas epileptiformes ictales e interictales en el EEG son muy útiles para diagnosticar las epilepsias, así como para localizar el foco epiléptico en el caso de epilepsias parciales con tratamiento quirúrgico (Doherty and Cole, 2001).

Se han realizado numerosos trabajos con registros de vídeo-EEG en modelos de ratón de enfermedades epilépticas (Pitkanen A., 2006). En este trabajo se han llevado a cabo estudios con registros corticales de vídeo-EEG en los dos modelos de la enfermedad de Lafora, los ratones deficientes para la proteína laforina (ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>) y para la proteína malina (ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>) y en los ratones transgénicos de la proteína tau humana mutada (ratones *Tau*<sup>VLW</sup>) que presentan crisis epilépticas espontáneas.

## **OBJETIVOS**

Con el propósito de obtener información sobre el origen de la actividad epileptiforme y otras alteraciones funcionales que presentan los pacientes con la enfermedad de Lafora, en esta Tesis Doctoral nos planteamos estudiar dos modelos animales obtenidos de esta enfermedad. Estos dos modelos se generaron mediante la eliminación de la expresión de los genes *Epm2a* y *Epm2b*, los dos genes conocidos hasta el momento como responsables de la aparición de la enfermedad. También quisimos examinar las causas de la aparición de epilepsia en ciertos casos de pacientes con ciertas taupatías, como la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17, utilizando para ello, un modelo de ratón transgénico de la proteína tau.

Los objetivos concretos que nos planteamos fueron los siguientes:

- 1- Analizar las alteraciones de comportamiento motor, de memoria y de actividad epileptiforme producidas por la ausencia de la proteína laforina en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y de la proteína malina en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>.
- 2- Estudiar las alteraciones de la actividad electroencefalográfica en los ratones *Tau*<sup>VLW</sup> producidas por la sobre-expresión del transgen hTauVLW.
- 3- Determinar el umbral de aparición de actividad epiléptica con el agente epileptógeno PTZ, antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>, y la resistencia a la toxicidad de dicha sustancia de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>, *Epm2b*<sup>-/-</sup> y *Tau*<sup>VLW</sup>.

Los resultados obtenidos nos permitirán diseñar un sistema experimental con el que se ensayarán diferentes sustancias para intentar desarrollar nuevas terapias que puedan mejorar los síntomas de estas enfermedades.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Animales de experimentación

El empleo de los animales de experimentación, se llevó a cabo en riguroso cumplimiento de las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y de la legislación española vigente en cuanto al empleo, protección y cuidado de los animales de experimentación (Real decreto 1201/2005) y fueron previamente aprobados por el Comité de Investigación Animal de nuestra Institución.

Los experimentos de comportamiento en los modelos animales de Lafora se llevaron a cabo distribuyendo a los animales en dos grupos de edad, el grupo de jóvenes, de 4-8 meses, y el grupo de adultos, de 9-18 meses de edad. En cada uno de los grupos se utilizaron de 12 a 25 animales de ambos sexos. Para los estudios con el agente químico PTZ se emplearon de 10 a 38 ratones de cada grupo de edad con cada una de las dosis administradas.

Para los estudios del modelo de demencia frontotemporal, los ratones se repartieron en tres grupos de diferentes edades, el de animales jóvenes, de 1-5 meses, el de adultos jóvenes, de 6-14 meses, y el de adultos-seniles, de 15-23 meses de edad. Se utilizaron de 5 a 38 ratones en cada grupo y a cada de dosis de PTZ administrada.

### 1.1. Ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>

Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> corresponden a una línea de ratones nulos para la expresión del gen *Epm2a* generada mediante la eliminación del cuarto exón del gen, que codifica el dominio catalítico DSPD, fundamental para la función de la proteína laforina (Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999). Fueron amablemente cedidos por el Dr. Delgado-Escueta, de la Universidad de California en Los Ángeles, EEUU (Ganesh et al., 2002).

### 1.2. Ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>

La línea de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>, nulos para la expresión del gen *Epm2b*, se generó mediante eliminación del único exón del gen que codifica la proteína malina, en GenOway, Lyon, France (Criado et al., 2011).

### 1.3. Ratones *Tau*<sup>VLW</sup>

Los ratones *Tau*<sup>VLW</sup> corresponden a una línea de ratones transgénicos que sobreexpresan una isoforma de la proteína tau humana con dos insertos en la región amino-terminal, con cuatro repeticiones en el dominio de unión a tubulina y con tres de las mutaciones características de la FTDP-17, G272V, P301L y R406W, bajo el control del promotor específico neuronal Thy-1, amablemente cedidos por el Dr. Lim (Lim et al., 2001).

### 1.4. Ratones control

Para el grupo control se emplearon ratones de la cepa C57BL/6 (Charles River Laboratories, L'Arbresle Cedex, Francia) ya que los ratones nulos *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> se generaron originariamente en el fondo genético 129Sv;C57BL/6 y los transgénicos en el fondo CBA;C57BL/6.

### 1.5. Mantenimiento de los animales

Los ratones han sido mantenidos en el animalario de nuestra Institución, el IIS-Fundación Jiménez Díaz, en jaulas de tamaño estándar, sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso a comida (dieta estándar, Safe Scientific Animal Food & Engineering, Augy, Francia) y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron sacrificando el mínimo número de animales por experimento y reduciendo al máximo su sufrimiento.

### 1.6. Genotipado

Se genotiparon ratones control y mutantes *Epm2a*<sup>-/-</sup>, *Epm2b*<sup>-/-</sup> y *Tau*<sup>VLW</sup> de forma aleatoria, de diferentes edades y sexo. Se les seccionó la punta de la cola y se recogió una gota de sangre de cada uno de ellos, para su amplificación por PCR con un kit KAPA blood PCR mix B (Cultek, Boston, Massachusetts, EEUU). Los oligonucleótidos cebadores empleados se representan en la Tabla 1.

Las condiciones de la amplificación para el genotipado de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> fueron las siguientes: desnaturalización 5 min a 95°C, 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 57°C y 60 seg a 72°C, final de elongación 1 min a 72°C. Para los ratones



*Tau*<sup>VLW</sup>: desnaturalización 5 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C, final de elongación 1 min a 72°C (Veriti, Applied Biosystems, Foster City, EEUU).

Los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa (0,7%) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y tinción con bromuro de etidio 1 µg/ml. El tamaño del amplicón salvaje de laforina es de 554-bp; el mutante, de 400-bp; el salvaje de malina, 1.2 kb; el mutante de malina, de 2.6 kb; el amplicón del transgen hTauVLW, de 450-bp.

**Tabla 1. Relación de los oligonucleótidos cebadores utilizados**

Nombre del oligonucleótido cebador	Secuencia
Laforina sentido	5'-GCCACAGTTCAAGAGAGGAAGG-3'
Laforina anti-sentido	5'-CATCAGAGGTAGGGGAGCAAC-3'
Ausencia de laforina sentido	5'-CAGTTTCATAGCCTGAAGAACG-3'
Ausencia de laforina anti-sentido	5'-TTCCTTAACCTAAGCGTGAGGTC-3'
Malina sentido	5'-TGTCTTGAATGGAAGCACAGCCTTGA-3'
Malina anti-sentido	5'-ACTACCGTTACAGCTCCAGCTCTCGTTG-3'
Ausencia de malina sentido	5'-GAACCGCTGGCTCGAAGTTACCTGT-3'
Ausencia de malina anti-sentido	5'-CATCTCCTGTTTCCTGGGGTCAATGA-3'
Tau sentido TT1	5'-CTCTGCCCTCTGTTCTCTGG-3'
Tau antisentido TT2	5'-CCTGTCCCCCAACCCGTACG-3'

## 2. Análisis histopatológicos

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de Domtor (Pfizer, Espoo, Finlandia; 1 mg/ml) Ketolar (Pfizer, Espoo, Finlandia; 50 mg/ml) y agua estéril, en proporciones 1:1.5:1.5. Posteriormente, se perfundieron mediante punción cardíaca intraventricular, inicialmente con suero salino al 0.9% (BRAUN Medical S.A., Rubí, Barcelona, España) y después con paraformaldehído al 4% (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Barcelona, España) en tampón fosfato 0.2 M pH 7.2. Una vez finalizada la perfusión, se procedió a la extracción del cerebro, que se mantuvo en solución de paraformaldehído al 4% durante toda la noche a 4 °C.

## **2.1. Fijación e inclusión en parafina**

Tras la fijación, el cerebro se cortó en secciones coronales de 3-4 mm de grosor, que fueron incluidas en parafina utilizando un incluidor Leica TP 1020 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemania). En el incluidor, se sumergió la cubeta con las cápsulas que contenían las muestras en alcohol al 70% (2 h) y después en agua destilada (2 h). A continuación, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de disoluciones de etanol, 3 veces en etanol al 96% y 2 en etanol al 100% (30 min cada uno) y una vez más en etanol al 100% (1 h). Seguidamente, se pasaron por dos recipientes con xilol (45 min cada uno) y para finalizar, por dos recipientes más con parafina (45 min cada uno). Una vez acabado el proceso de inclusión, se procedió a la elaboración de los bloques de parafina con las muestras.

## **2.2. Cortes histológicos**

Se realizaron cortes seriados de los cerebros con un grosor de 5 a 7  $\mu\text{m}$  en un microtomo (Microm GmbH, Walldorf, Alemania) siguiendo el plano coronal. Los cortes se montaron en portaobjetos SuperFrost® Plus (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Alemania) previamente tratados para permitir la adhesión del tejido, se calentaron a 60°C y se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior uso en inmunohistoquímica y otras tinciones histológicas.

## **2.3. Tinción del ácido periódico de Schiff (*periodic acid-Schiff*, PAS)**

La reacción de PAS revela todo tipo de carbohidratos (glucógeno, mucopolisacáridos, glucolípidos, glucoproteínas etc.) en tinciones histológicas. Se basa en la rotura de los enlaces -C-C- presentes en los hidratos de carbono por la acción del ácido periódico, potente agente oxidante, liberándose grupos aldehído que al combinarse con el reactivo de Schiff dan un compuesto de color rojo púrpura intenso.

La tinción de PAS (Dako Diagnósticos S.A., Sant Just Desvern, Barcelona, España) fue realizada en el Departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz. Brevemente, los cortes se desparafinaron en xilol, se hidrataron con alcoholes de concentración decreciente (100%, 95% y 70%, durante 5 min en cada uno de ellos) y se incubaron con la solución de *Alsacian Blue* al 0.5% en ácido acético 3%,

pH 2.5 durante 1 min. A continuación, se trataron con ácido periódico al 0.5% durante 10 min y se lavaron con agua del grifo durante 10 min. Seguidamente se incubaron con el reactivo de Schiff durante 20 min, se lavaron con agua corriente durante 15 min y se contrastaron con Hematoxilina de Carazzi al 0.1% (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Barcelona, España). Por último, se lavaron durante 5 min, se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y en xilol y se finalizó el montaje con Depex (Serva GmbH, Heidelberg, Alemania).

## **2.4. Inmunohistoquímica**

Las secciones, previamente desparafinadas, fueron rehidratadas por inmersión en xilol y en una serie de alcoholes de graduación decreciente. Para la inmunohistoquímica con anticuerpos contra epítomos fosforilados de tau se realizó un procedimiento previo de desenmascaramiento de epítomos; para ello, las secciones fueron incubadas con buffer citrato 0,1 M pH 6.0 y sometidas a dos ciclos de irradiación de 2 min en microondas a 550W para llevarlas a ebullición. Se continuó con el bloqueo de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% en metanol durante 20 min. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M pH 7.4. Después, las secciones se incubaron con buffer de bloqueo (albúmina de suero bovino, BSA, al 1%, suero fetal bovino, FBS, al 5%, Tritón X-100 al 2% en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación (35 rpm) para, posteriormente, dejarlas incubando durante tres días a 4°C con el anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo. Se utilizaron los anticuerpos T14 (monoclonal, concentración 1:500) (Zymed Laboratories, INC, California, EEUU), el cual reconoce un epítopo presente en la proteína tau humana y que se haya ausente en la proteína tau endógena de ratón, el anticuerpo AT8 (monoclonal, concentración 1:100) (Pierce Endogen, Inc., Rockford, IL, EEUU), que está dirigido contra la Ser202 fosforilada presente en una región rica en prolinas de la proteína tau y el anticuerpo anti-ubiquitina (policlonal, concentración 1:500) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) para detectar moléculas de ubiquitina incorporadas en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos. A continuación, se realizaron 4 lavados con PBS y las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, concentración 1:250) en buffer de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación (35 rpm). Después de 3 lavados con PBS las secciones se tiñeron con el kit ABC Vectastain (Vector

Laboratories, Inc., Burlingame, CA) que reconoce las moléculas de biotina unidas al anticuerpo secundario, se lavaron 3 veces con PBS y seguidamente, se incubaron con diaminobenzidina (DAB, Dako Cytomation, Inc., Carpinteria, CA, EEUU) 1-3 min, la cual al oxidarse por la acción del  $H_2O_2$  forma un precipitado de color marrón, y se lavaron con agua durante 1 min. Posteriormente, se contrastaron con Hematoxilina de Carazzi al 0.1% (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Barcelona, España) 5 min y se retiraron los restos con agua. Por último, se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y en xilol y se finalizó el montaje con Depex (Serva GmbH, Heidelberg, Alemania).

## **2.5. Microscopia óptica**

Para la visualización de las muestras, se empleó un microscopio Leica DM LB1 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron adquiridas y capturadas mediante una cámara digital Leica DFC 320 acoplada al microscopio y procesadas utilizando el programa informático Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA).

## **3. Estudios de comportamiento motor**

Se realizaron diversos estudios de comportamiento motor para analizar la presencia de alteraciones en actividad motora, equilibrio y discinesias en el actímetro, el rotarod y mediante el test de suspensión de la cola, respectivamente, en los ratones deficientes para la expresión de laforina y malina.

### **3.1. Análisis de la actividad motora en el actímetro**

El actímetro se emplea para medir la actividad locomotora espontánea y la actividad exploratoria en base a los movimientos estereotipados, los alzamientos y los desplazamientos en animales de experimentación. Consta de una rejilla de células infrarrojas que permiten medir la magnitud de la actividad motora, basándose en el análisis de la posición y la frecuencia con que el animal corta los rayos infrarrojos (número de cuentas). Tras colocar al animal en el actímetro (LE8810, PanLab-Harvard Apparatus, Holliston, MA EEUU) se tomaron medidas de los movimientos tanto rápidos como lentos, con desplazamiento, estereotipados y alzamientos a los 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min (Navarro et al., 2008a).

### **3.2. Experimentos de coordinación motora y equilibrio en el rotarod**

Los experimentos se realizaron en un rotarod LE8200 (PanLab-Harvard Apparatus, Holliston, MA EEUU) según el procedimiento descrito en (Navarro et al., 2008a; Rozas et al., 1998). El rotarod es un equipo diseñado para el análisis de la coordinación motora y el equilibrio en animales de experimentación. Consiste en un tambor central (hecho de plexiglás estriado, para que el animal se sujete en él) dividido en cinco secciones, que rota a velocidad constante o acelerada, según las necesidades del experimento. Se colocaron los animales en el rodillo estacionario y se les entrenó para estar sobre él cuando rotaba a 4 y a 8 rpm durante los dos días previos al experimento. Así, el primer día de entrenamiento se les enseñó con 4 pruebas de 1 min a 4 rpm (dos por la mañana y dos por la tarde, separadas entre sí 30 min) y el segundo día, con dos sesiones por la mañana, de 4 rpm durante 1 min, con un intervalo de 30 min entre ellas y 2 sesiones de 4 rpm y 8 rpm durante 1 min, que tuvieron lugar por la tarde, separadas la una de la otra por un periodo de 60 min. Se analizaron los animales en el cilindro, cuya velocidad fue constantemente acelerada de 4 a 40 rpm en 5 min, dos veces al día durante los dos días sucesivos al entrenamiento (sesiones S1-S4). Se registró el tiempo que tardaban en caerse del rodillo (periodo de latencia).

### **3.3. Estudios de las alteraciones de postura y discinesias mediante el test de suspensión de la cola**

El test de suspensión de la cola (*Tail Suspension Test, TST*) se utiliza para medir alteraciones neurológicas en ratones (Carter et al., 1999; Fernagut et al., 2002; Reddy et al., 1998) y refleja signos de discinesias (movimientos anormales) y posturas anormales de las extremidades posteriores. Para realizarlo, se levanta al ratón agarrándole por la mitad de la cola durante 15 seg y se valora la conducta aplicando una escala de comportamiento motor: “0” si el animal extiende completamente las extremidades posteriores, “1” cuando el animal encoge intermitentemente una o las dos patas, o “2” si mantiene dobladas las patas traseras junto al abdomen.

## **4. Estudios de memoria mediante el test de reconocimiento de objetos**

El test de reconocimiento de objetos (*Object Recognition Task, ORT*) se utiliza para medir la memoria episódica o memoria a corto plazo. El equipo consiste en una

caja de madera de color negro de dimensiones 50 x 50 x 50 cm. El procedimiento utilizado se describe en (Navarro et al., 2008b). En primer lugar, se colocó al animal en la caja vacía durante 10 min para su adaptación. Transcurridas dos horas, se colocaron dos objetos iguales en cuanto a forma, tamaño y color (fichas Lego) en el centro de la caja (objetos A y B) y se midió el tiempo que el animal exploraba cada ficha ( $t_A$  y  $t_B$ ) durante 10 min. Dos horas después, se sustituyó una de las fichas por otra de diferentes características (objeto C) y se registró el tiempo que el animal exploraba cada una de ellas ( $t_A$  y  $t_C$ ) en 10 min. Se consideró exploración cuando el animal tocaba el objeto con la nariz o las patas delanteras o si se aproximaba a él a una distancia no mayor de 2 cm. No se consideró exploración cuando el animal se subía a la ficha (Bevins and Besheer, 2006). Entre cada una de las sesiones se limpió tanto la caja como las fichas con etanol al 70%. Se eliminaron del estudio aquellos animales cuyo tiempo total de exploración de los dos objetos iguales fue  $\leq 3$  seg y todos aquellos ratones cuyo tiempo total de exploración de cada uno de los objetos diferentes fue  $\leq 1$  seg (Navarro et al., 2008b). El índice de discriminación, medida de la capacidad del animal para diferenciar un objeto nuevo de uno conocido, se calculó como la diferencia entre el tiempo de exploración del objeto nuevo ( $t_C$ ) y del objeto familiar ( $t_A$ ) con respecto al tiempo total de exploración ( $t_T = t_A + t_C$ ) empleándose la siguiente fórmula:  $ID = t_C - t_A / t_T$ .

## 5. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron aplicando el test estadístico *t-Student* con el programa estadístico GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, Inc.). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ .

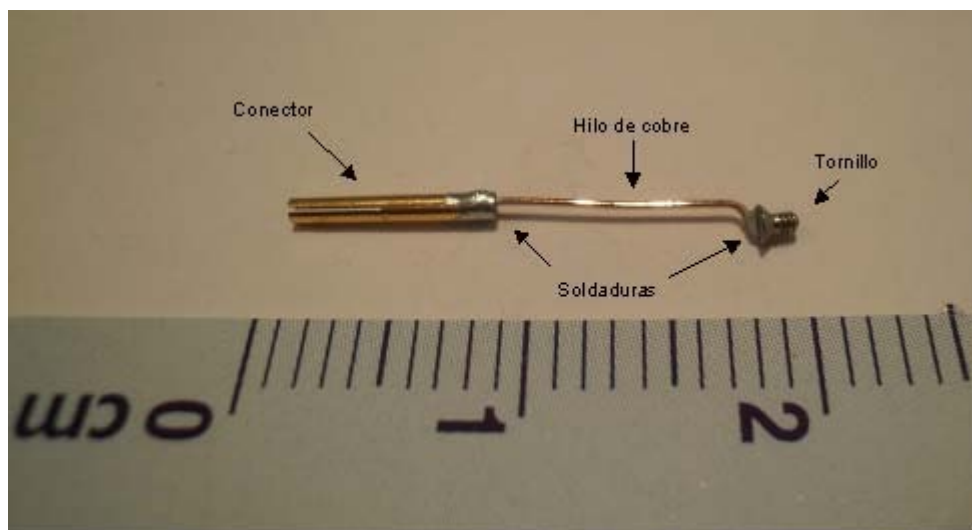
## 6. Registros de vídeo-EEG

Para la realización del video-EEG, se utilizaron cuatro electrodos epidurales que se elaboraron en el laboratorio, como se describe a continuación y se implantaron intracranealmente en los animales previamente anestesiados. Tras unos días de recuperación de la operación, los animales se registraron en un equipo de vídeo-EEG.

### 6.1. Elaboración de los electrodos

Los electrodos constan de un cable de cobre de 9-10 mm de longitud biológicamente inerte (Avisor SA; Barcelona, España) un conector en un extremo

(Plastics One, Roanoke, VA, EEUU) y un tornillo de joyería de acero inoxidable 316 L, de dimensiones 1,55 x 1,55 x 0,90 mm (diámetro x longitud x rosca) (IsoSwiss, Boecourt, Suiza) en el otro (Fig. 9). Para su elaboración, se retiró con un bisturí aproximadamente 1 mm del plástico aislante de cada extremo del cable de cobre para soldar con estaño (super solder wire, Golden Solder, Taiwan) el conector en uno de los extremos y el tornillo de acero inoxidable en el otro. Con un ohmnímetro (Silver Electronics, Barcelona, España) se revisó la continuidad entre ambos extremos de los electrodos, para comprobar que el conector y el tornillo estaban conectados correctamente al cable.



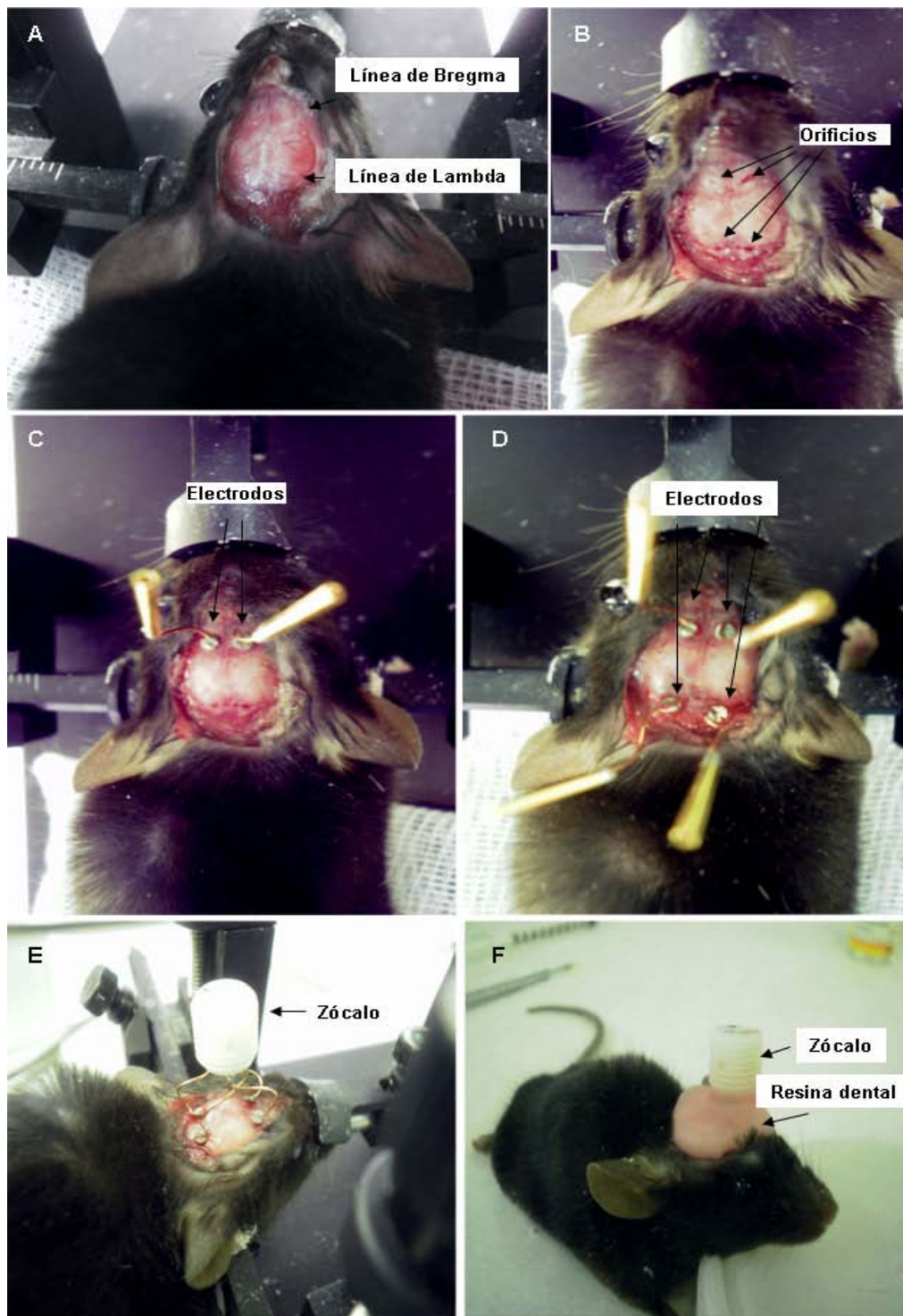
**Figura 9. Electrodo cerebral para implantes intracraneales en ratón.** Un electrodo consta de un hilo de cobre de 9-10 mm, un conector y un tornillo de acero inoxidable, que están soldados entre sí con estaño.

## 6.2. Implantación de los electrodos intracraneales en ratones

Para proceder a la implantación intracraneal de los electrodos, se anestesió a los animales de forma intraperitoneal con una mezcla de Domtor:Ketolar:agua estéril, (1:1.5:1.5) y se les rasuró el pelo de la cabeza. Se inmovilizó el animal en posición *decúbito prono* utilizando un fijador Cunningham (Stoelting, IL, EEUU) mediante dos barras de plástico laterales que se introdujeron en los conductos auditivos externos y otro dispositivo colocado en los dientes incisivos superiores. A continuación, se realizó una incisión siguiendo el plano sagital del cráneo y se separó la piel del mismo. La zona descubierta del cráneo se lavó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 4% para hacer visible la línea de Bregma

(Fig. 10A). A continuación, se realizaron en el cráneo de los ratones cuatro orificios de aproximadamente 0.9 mm de diámetro con una micro-fresa (Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Alemania) para permitir la implantación de los electrodos intracranealmente, los cuales se atornillaron en dichos orificios (Fig. 10B). Los dos electrodos registradores se colocaron delante de la línea de Bregma (Fig. 10C). Detrás de la línea de Lambda, se colocó un electrodo de referencia y un electrodo de masa o tierra (Fig. 10D). A continuación, se acopló un zócalo (Plastics One, Roanoke, VA, EEUU) para agrupar los conectores (Fig. 10E) y finalmente, todo ello se fijó al cráneo con una resina dental auto-polimerizable (Selectaplug CN, Dentsply DeTrey GmbH, Dreieich, Alemania) (Fig. 10F). Después de la operación, se inyectó a los animales de forma subcutánea 1 ml de NaCl al 0.9% (BRAUN Medical S.A., Rubí, Barcelona, España) para rehidratarlos y 0,5 mg/kg Antisedan (Pfizer, Espoo, Finlandia) como contra-anestesia.

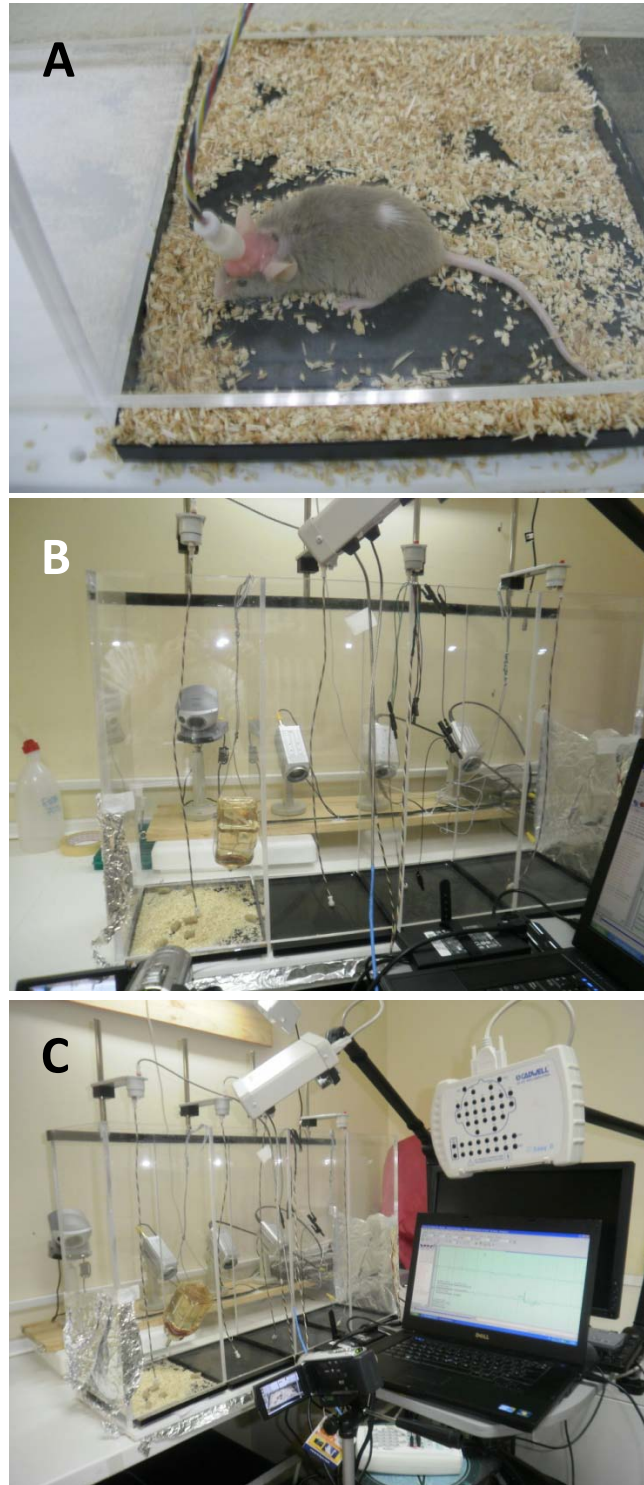




**Figura 10. Implantación de electrodos intracraneales en ratón.** Visualización de las líneas de Bregma y Lambda (A). Realización de los orificios para la implantación de los electrodos, dos delante de la línea de Bregma y dos tras la línea de Lambda (B). Implantación de los dos electrodos registradores, delante de la línea de Bregma (C). Colocación de los electrodos de referencia y de masa o tierra, tras la línea de Lambda (D). Colocación del zócalo para agrupar los conectores (E). Fijación al cráneo con resina dental (F).

### 6.3. Registro de vídeo-EEG

Transcurridos 3 días después de la operación, se procedió a la realización del registro monopolar de vídeo-EEG durante 1h - 4días, usando un equipo Easy-EEG 2.1 (Cadwell, Lugo, España) y Natus Neurowork EEG (Natus Medical Inc., San Carlos, CA. EEUU) (Fig. 11). A través del zócalo, el ratón es conectado con un cable al amplificador del equipo de registro (Fig. 11A) con un dispositivo rotatorio que permite al ratón disponer en todo momento de libertad de movimiento, así como de acceso a comida y agua *ad libitum* (Fig. 11B). El equipo está dotado de un sistema de canales que permite registrar hasta 4 ratones a la vez. Los registros se realizaron usando 100 Hz de filtro de paso alto, 0.5 Hz de filtro de paso bajo y una sensibilidad de 30  $\mu\text{V}/\text{mm}$ . El equipo lleva acoplada una cámara de video (Sony Handycam DCR-SX34, Tokio, Japón) que permite que el registro de EEG y la grabación del animal se realice en tiempo real (Fig. 11C).



**Figura 11. Equipo para el registro de vídeo-EEG en ratones.** El zócalo con los conectores de los electrodos implantados intracranealmente en el ratón se conecta al equipo de registro a través de un dispositivo rotatorio móvil que permite al ratón moverse en el espacio libremente (A). El animal dispone en todo momento de comida y agua (B). Simultáneamente a la grabación del registro, se realiza una grabación de imagen de vídeo con una cámara Sony Handycam (C).

#### **6.4. Administración de PTZ**

El PTZ (Sigma Chemicals, St. Louis, EEUU) es un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub> (Stone, 1970) que provoca crisis tónico-clónicas en animales de experimentación. Para su empleo, el PTZ se puede disolver en suero salino o agua y la manera más frecuente de administrarlo es intraperitoneal, pero también puede ser administrado de forma subcutánea o intravenosa. Este agente químico se inyectó a los animales intraperitonealmente en una única dosis a diferentes concentraciones: 30 mg/kg, dosis subconvulsiva (Erakovic et al., 2001); 50 mg/kg, dosis epileptógena (Eloqayli et al., 2003; Erakovic et al., 2001) y; 75 mg/kg, dosis letal (Keskil et al., 2001). La dosis de 50 mg/kg produce crisis epilépticas en el 50% de los ratones control (Shitak et al., 2006). Tras la inyección del fármaco se evaluaron la presencia de convulsiones y crisis, el tiempo transcurrido hasta que apareció la primera crisis, la duración de las crisis y la resistencia al PTZ.

## **RESULTADOS**

## 1. Modelos animales de la enfermedad de Lafora

En este trabajo se han utilizado dos modelos específicos de la enfermedad de Lafora generados mediante la eliminación de la expresión de los genes *Epm2a* y *Epm2b*, genes responsables de la enfermedad y que codifican las proteínas laforina y malina, por mecanismos de manipulación genética en células embrionarias pluripotentes, para estudiar las alteraciones neurológicas que producen la ausencia de dichas proteínas.

### 1.1. Ratones nulos para la expresión de la proteína laforina

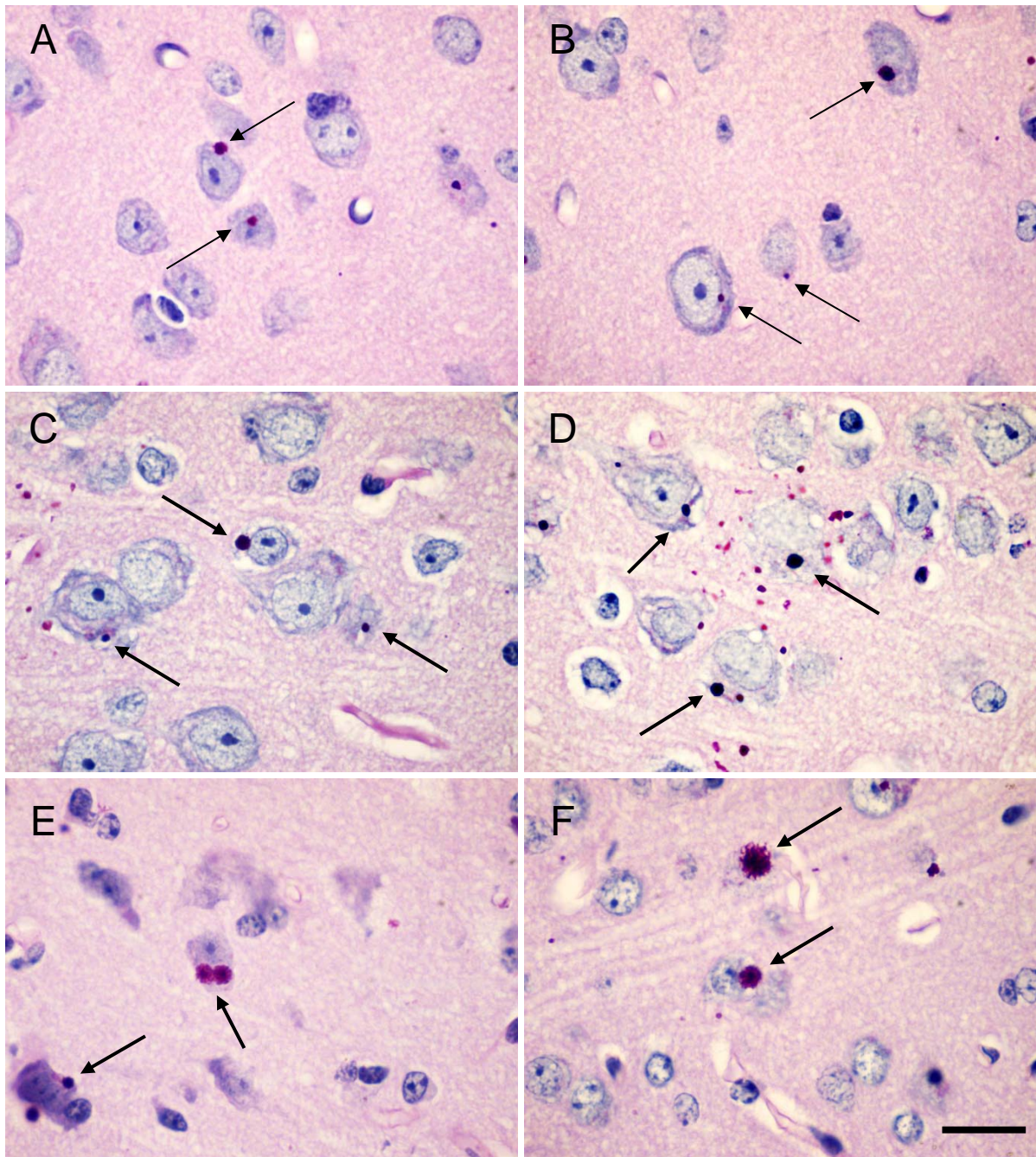
Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>, nulos para la expresión de la proteína laforina, se generaron mediante la eliminación del cuarto exón del gen (Ganesh et al., 2002a), que codifica el dominio fosfatasa de especificidad doble. Estos ratones se desarrollan normalmente y son fértiles pero comienzan a presentar alteraciones neurológicas y de comportamiento a partir de los 4 meses de edad, poco después de la observación de los primeros signos de neurodegeneración y de la aparición de los cuerpos de Lafora. Estas alteraciones se agravan con la edad, a medida que los cuerpos de Lafora se hacen más prominentes (Ganesh et al., 2002a).

#### 1.1.1. Presencia de cuerpos de Lafora en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>

Mediante la tinción de PAS, se comprobó la presencia de los cuerpos de Lafora en nuestra línea de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> a los 3, a los 7 y a los 17 meses de edad (Fig. 12). La Figura 12 muestra ejemplos de inclusiones de Lafora a estas edades en las capas IV (Fig. 12A, C y E) y V (Fig. 12B, D y F) de la corteza cerebral. A los 3 meses de edad, ya se encuentran los primeros, poco numerosos, cuerpos de Lafora en el cerebro (Fig. 12A y B), que empezaron a aparecer a los 2 meses (Ganesh et al., 2002a). Estas inclusiones, al igual que las que aparecen a los 7 meses, presentan un tamaño mucho menor que en edades posteriores, aunque en los cerebros de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> a los 7 meses de edad, son significativamente más abundantes (Fig. 12C y D). A los 17 meses de edad, los cuerpos de Lafora presentan un tamaño y número notablemente mayor (Fig. 12E y F). También se observaron cuerpos de Lafora en hipocampo, núcleos basales, núcleos talámicos, cerebelo, núcleos del troncoencéfalo, bulbo olfatorio y otras regiones cerebrales, que también eran de mayor tamaño y notablemente más abundantes en los



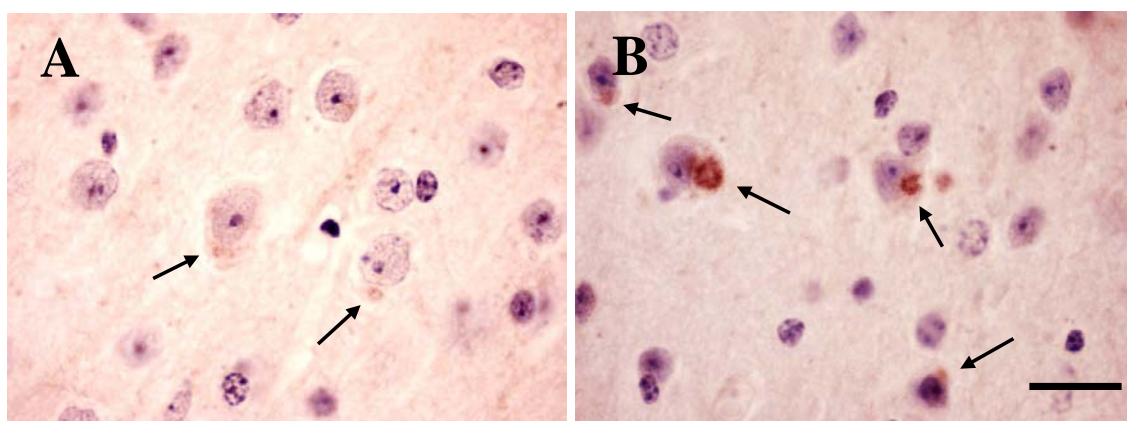
ratones de 17 meses de edad (datos no mostrados), como se había descrito previamente (Ganesh et al., 2002a).



**Figura 12. Cuerpos de Lafora en cerebro de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>.** La figura muestra inclusiones citoplasmáticas teñidas con la tinción de PAS (flechas) en capas IV (A, C y E) y V (B, D y F) de corteza cerebral en ratones de 3 meses (A y B) en ratones de 7 meses (C y D) y en ratones de 17 meses de edad (E y F). La barra de aumentos corresponde a 22  $\mu$ m.

Adicionalmente se analizó la presencia de ubiquitina en secciones de cerebro adyacentes a las mostradas anteriormente para verificar que los cuerpos de Lafora

presentan también acúmulos de proteínas ubiquitinadas (Ganesh et al., 2002a; Criado et al., 2011). A los 7 meses de edad, se observaron estructuras intracelulares de pequeño tamaño con el anticuerpo dirigido contra ubiquitina (Fig. 13A) que eran poco abundantes y presentaban un marcaje tenue. Sin embargo, en secciones de cerebro de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 17 meses de edad, se observaron abundantes inclusiones intracelulares identificadas con este anticuerpo frente a ubiquitina, de mayor tamaño y que presentaban un centro claro con un marcaje muy denso en la periferia (Fig. 13B).



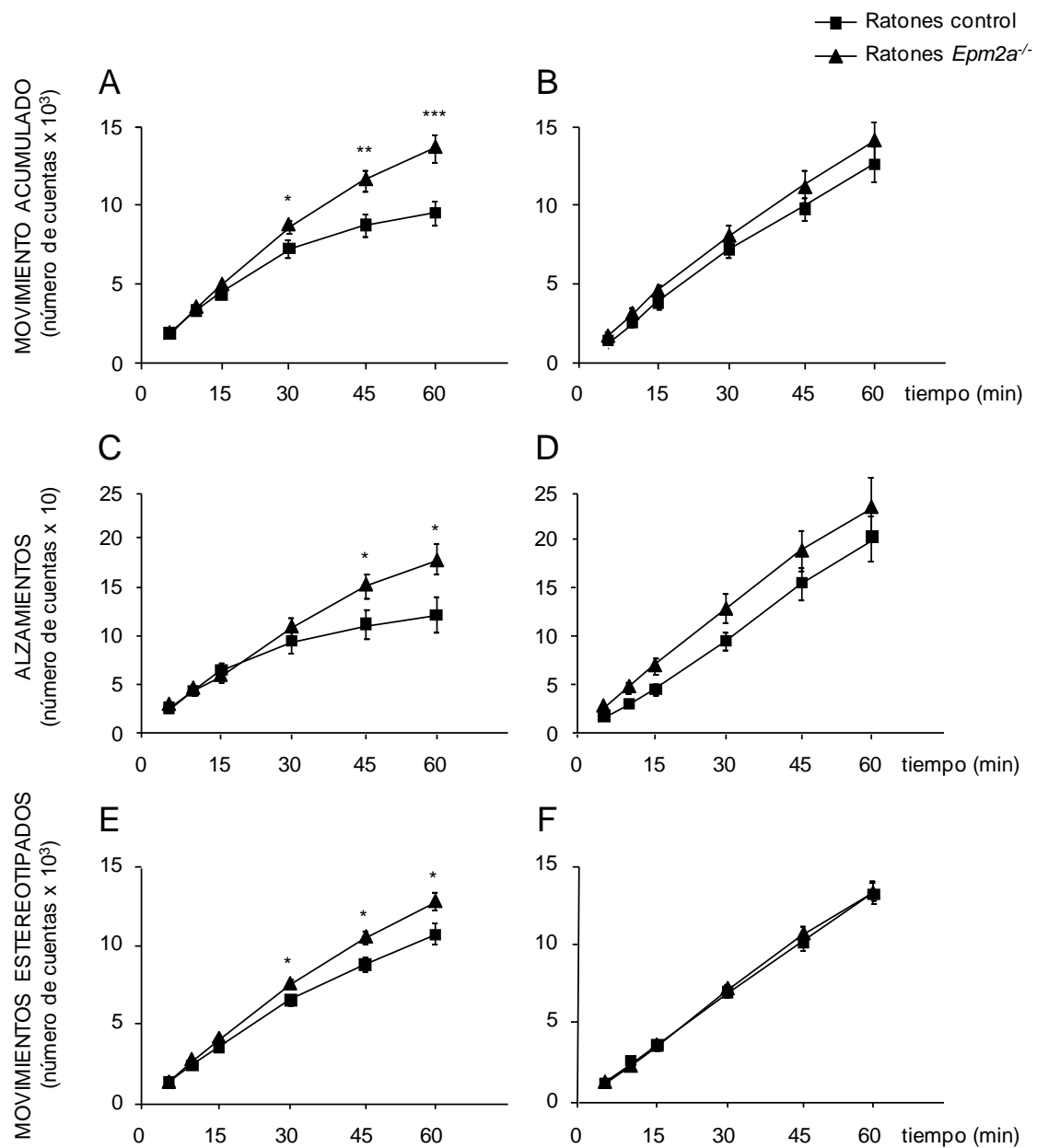
**Figura 13. Presencia de ubiquitina en la corteza cerebral de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>.** Inclusiones intracelulares identificadas con el anticuerpo dirigido contra ubiquitina (flechas) en capa V de corteza cerebral de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 7 meses (A) y de 17 meses de edad (B). Este marcaje se localiza en estructuras similares a las inclusiones citoplasmáticas teñidas con PAS (Fig. 12). La barra de aumentos corresponde a 22  $\mu$ m.

### **1.1.2. Alteraciones de la actividad motora en los ratones deficientes para la expresión de laforina**

La actividad locomotora y exploratoria espontáneas de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> se estudiaron en un actímetro (Fig. 14). Para este estudio se utilizaron ratones jóvenes (4-8 meses) y ratones adultos (9-18 meses) tanto controles como nulos para la expresión de laforina. En el análisis de los movimientos con desplazamiento (Fig. 14A y B) se observó un incremento continuo en el número de cuentas recogidas como actividad espontánea en ratones mutantes *Epm2a*<sup>-/-</sup> jóvenes, mientras que en los controles no se observó el citado incremento ya que los ratones dejaban de explorar al conocer el entorno (Fig. 14A); esta diferencia fue estadísticamente significativa en la cantidad de movimiento con desplazamiento a partir del minuto 30 en ratones jóvenes nulos para la expresión de laforina. Sin embargo, aunque la cantidad de movimiento con



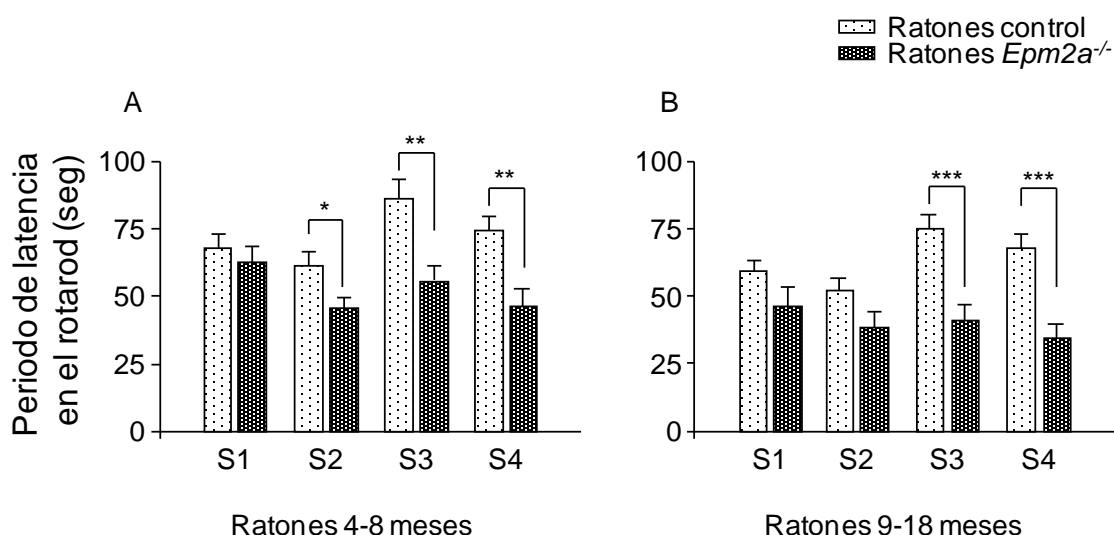
desplazamiento de los ratones mutantes de 9-18 meses mostró una tendencia a aumentar con respecto a los controles, esta diferencia no fue significativa (Fig. 14B). Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 4-8 meses de edad también mostraron un incremento significativo en la cantidad de alzamientos (Fig. 14C) y de los movimientos estereotipados (Fig. 14E) a partir de los 45 y de los 30 min respectivamente, al ser comparados con los ratones control de la misma edad. A los 9-18 meses de edad los ratones nulos para la expresión de laforina manifestaron una cantidad de alzamientos ligeramente superior a la de los ratones control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 14D). Por el contrario, la cantidad de movimientos estereotipados de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de esta misma edad fue similar a la de los animales control (Fig. 14F). Estos resultados reflejan que la ausencia de expresión de laforina produce en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> un estado de hiperactividad que se manifiesta en un aumento de la cantidad de movimiento y del comportamiento exploratorio espontáneos, principalmente en el grupo de ratones jóvenes.



**Figura 14. Actividad locomotora espontánea y actividad exploratoria en ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>.** En la gráfica se muestra el número de cuentas recogidas en el actímetro a los 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min en ratones de 4–8 (A, C y E) y de 9–18 (B, D y F) meses de edad. Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 4–8 meses de edad mostraron un incremento continuo en sus movimientos a lo largo del test, tanto en movimiento superficial (A) como en alzamientos (B) y en movimientos estereotipados (C). Esta tendencia también se observaba en los ratones adultos para los movimientos superficiales y de alzamientos, aunque las diferencias no fueron significativas (B y D). En el caso de los movimientos estereotipados, el grupo de ratones adultos se comportó de forma similar al grupo control (F). Los datos se analizaron usando un test *t-Student*. Los valores se representaron como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  ( $n = 17-25$ ).

### 1.1.3. Alteraciones de la coordinación motora y del equilibrio en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>

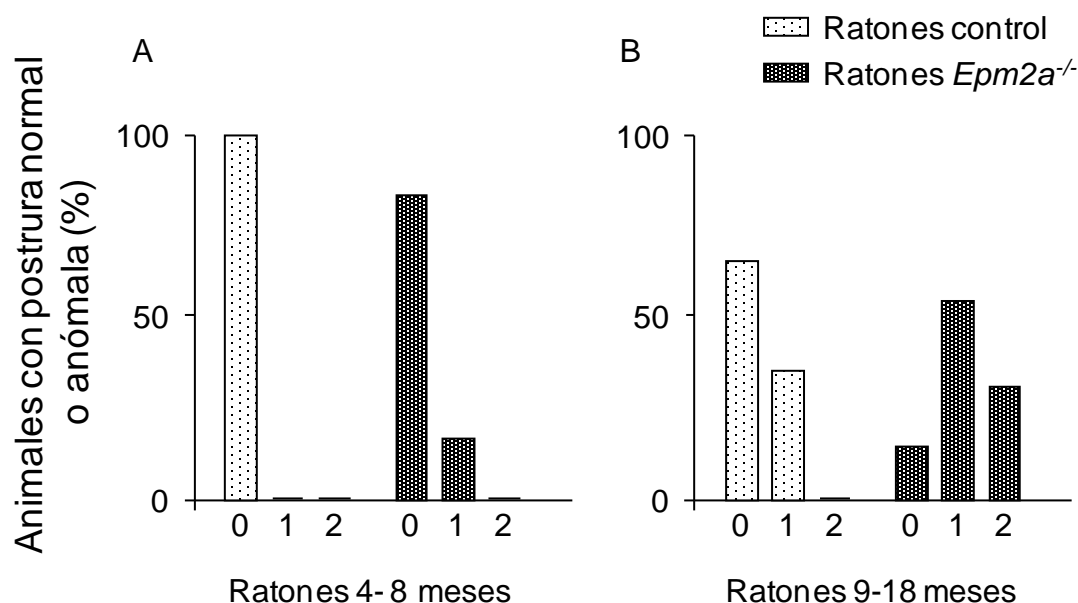
Para analizar las posibles alteraciones en la coordinación motora y el equilibrio de los ratones en ausencia de la proteína laforina se realizó el test de rotarod. El periodo de latencia, tiempo que tardaron los ratones en desprenderse del rodillo del rotarod cuando éste rotaba a velocidad constante, se midió en los ratones control y en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> en dos grupos de edad, ratones de 4-8 meses y ratones de 9-18 meses de edad, en cuatro sesiones, S1 y S2 el primer día del test, y S3 y S4 el segundo día (Fig. 15). A los 4-8 meses de edad, los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> mostraron un periodo de latencia significativamente menor que los controles (S2-S4) (Fig. 15A), es decir, permanecían menos tiempo sobre el rodillo del rotarod. En el grupo de ratones de 9-18 meses de edad, también se encontraron diferencias significativas, presentando los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> un menor tiempo de permanencia sobre el rodillo del rotarod que los ratones control (Fig. 15B). Estos resultados indican que la ausencia de expresión de laforina produce una alteración significativa en la coordinación motora, hecho que se refleja en una disminución del tiempo que los ratones mutantes son capaces de mantenerse sobre el rodillo del rotarod.



**Figura 15. Análisis de la coordinación motora y el equilibrio de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> en el rotarod.** Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> permanecieron menos tiempo sobre el rodillo del rotarod que los ratones control tanto a los 4–8 meses (A) como a los 9–18 meses (B) de edad, en dos sesiones diarias (S1-S2 el primer día y S3-S4 el segundo día). Los datos se analizaron usando el test *t-Student*. \**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001 (n = 18-25).

#### 1.1.4. Discinesias y posturas anormales en el test de suspensión de la cola

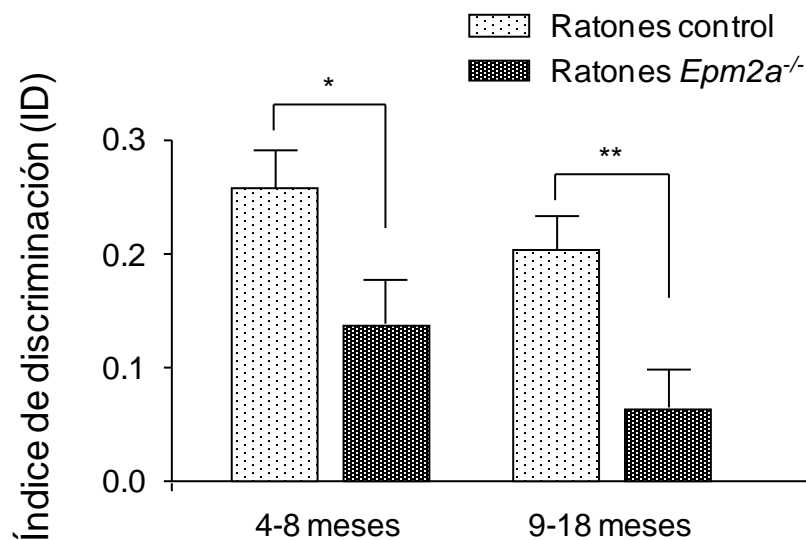
Para valorar si los ratones manifestaban alteraciones neurológicas provocadas por la ausencia de la proteína laforina se empleó el test de suspensión de la cola. Este test refleja signos de discinesias (movimientos anormales) y postura anormal de las extremidades posteriores al suspender al ratón por la mitad de la cola (Carter et al., 1999; Fernagut et al., 2002; Reddy et al., 1998). Para llevar a cabo el ensayo, se distribuyeron, nuevamente, a los ratones en dos grupos de edad, ratones jóvenes (4-8 meses) y ratones adultos (9-18 meses) (Fig. 16). A los 4-8 meses de edad, un 18% de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> mostraron un nivel de alteraciones de postura y de movimiento leves, clasificado como nivel “1”, que se reflejaba en una flexión anormal y extensión de las patas posteriores de forma intermitente, mientras que el resto (82%) y ninguno de los animales control manifestaron una postura anormal (Fig. 16A). En el grupo de ratones de 9-18 meses de edad, un 55% de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> mostró discinesias y posturas anormales de nivel “1”, mientras que hasta un 30% mostraron alteraciones graves de nivel “2” (las patas traseras permanecían dobladas hacia el abdomen durante todo el test) siendo sólo un 15% de los ratones los que mostraron una postura correcta (clasificados como nivel “0”) (Fig. 16B). En el caso de los ratones control de 9-18 meses, el 65% de los ratones mostraron una postura normal y el 35% mostró alteraciones de nivel “1” (Fig. 16B) probablemente debidas a problemas derivados de la edad.



**Figura 16. Estudio de las alteraciones de postura y discinesias en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> empleando el test de suspensión de la cola.** La figura muestra el porcentaje de animales de 4-8 (A) y de 9-18 (B) meses de edad que mostraron discinesias y postura normal o anormal cuando se les suspendió por la mitad de la cola. Se asignó nivel “0” cuando las patas traseras estaban completamente estiradas, indicando postura normal; nivel “1” si el animal encogía intermitentemente una o las dos patas; y nivel “2” cuando ambas patas traseras estaban completamente dobladas hacia el abdomen (n = 13-36).

### 1.1.5. Déficit de la memoria episódica en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>

Para comprobar si los ratones manifestaban alteraciones de memoria a corto plazo, o memoria episódica, debidas a la ausencia de laforina como se ha descrito en humanos (Berkovic et al., 1986; Chan et al., 2004; Ganesh et al., 2002b; Van Heycop Ten Ham, 1974), se empleó el test de reconocimiento de objetos distribuyendo a los ratones en dos grupos de edad, ratones jóvenes (4-8 meses) y adultos (9-18 meses) (Fig. 17). En la fase test, se midió el tiempo de exploración de dos objetos diferentes en los dos grupos de ratones de distintas edades y se calculó el índice de discriminación ( $ID = tC - tA / tT$ ). Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 4-8 meses mostraron un ID menor que el de los animales control en el mismo rango de edad (Fig. 17), indicando que la ausencia de laforina en ratones jóvenes produce una deficiencia en la memoria a corto plazo. Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 9-18 meses de edad también mostraron un ID menor que los controles y en este grupo nuevamente las diferencias fueron estadísticamente significativas, a pesar de la pérdida de memoria ligada a la edad que también se produce en los animales control (Fig. 17).

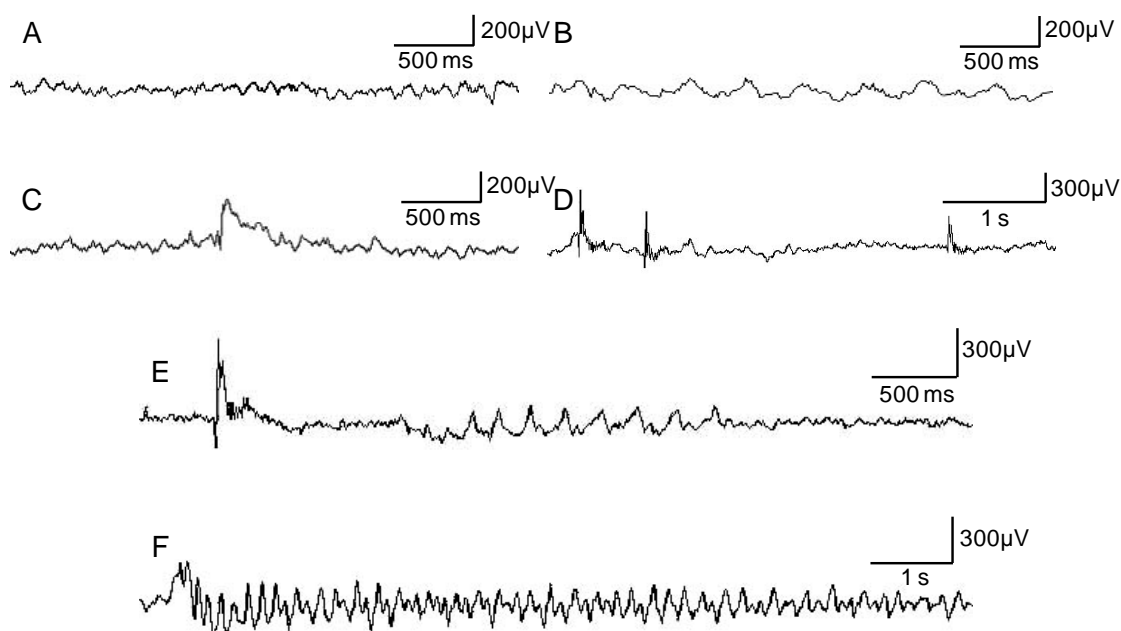


**Figura 17. Análisis de memoria a corto plazo de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> mediante el test de reconocimiento de objetos.** Los ratones se dividieron en dos grupos de edad, ratones jóvenes (4-8 meses) y adultos (9-18 meses). El índice de discriminación (ID) se calculó como la razón entre la diferencia del tiempo de exploración de un objeto nuevo (*t*C) y uno conocido (*t*A), y el tiempo total de exploración (*t*T = *t*A+*t*C) ( $ID = \frac{tC - tA}{tT}$ ). Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> mostraron un ID significativamente menor a los 4-8 meses de edad mientras que en el grupo de 9-18 meses esta deficiencia se intensificó notablemente. Los datos se analizaron usando el test *t-Student*. \**p*<0.05; \*\**p*<0.01 (n = 17-29).

### **1.1.6. Actividad electroencefalográfica cortical de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>**

Para analizar las posibles alteraciones en la actividad electroencefalográfica de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> se realizaron registros con un equipo de vídeo-EEG computerizado. Se implantaron dos electrodos registradores corticales delante de la línea de Bregma (Fig. 10C) y un electrodo de referencia y otro de tierra detrás de la línea de Lambda (Fig. 10D). Tres días después de la implantación de los electrodos se procedió al registro de vídeo y de la actividad electroencefalográfica de base de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y de los ratones control (Fig. 18).

Los ratones control presentan una actividad de fondo basal de 6-7 Hz (Buzsaki, 2002) (Fig. 18A y B). Tras la revisión de los registros y los vídeos, se observó que los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> a partir de los 4 meses de edad presentaban mioclonías, que se manifestaban en el registro electroencefalográfico como complejos de punta-onda (Fig. 18C) y polipuntas (Fig. 18D). A partir de los 9 meses de edad también presentaban crisis epilépticas tónico-clónicas espontáneas de 3 a 30 seg de duración, que se reflejaban en el registro electroencefalográfico como complejos de punta-onda a 4-6 Hz (Fig. 18E y F). A veces las crisis aparecían después de varias convulsiones que se correspondían con descargas de polipuntas (Fig. 18E).

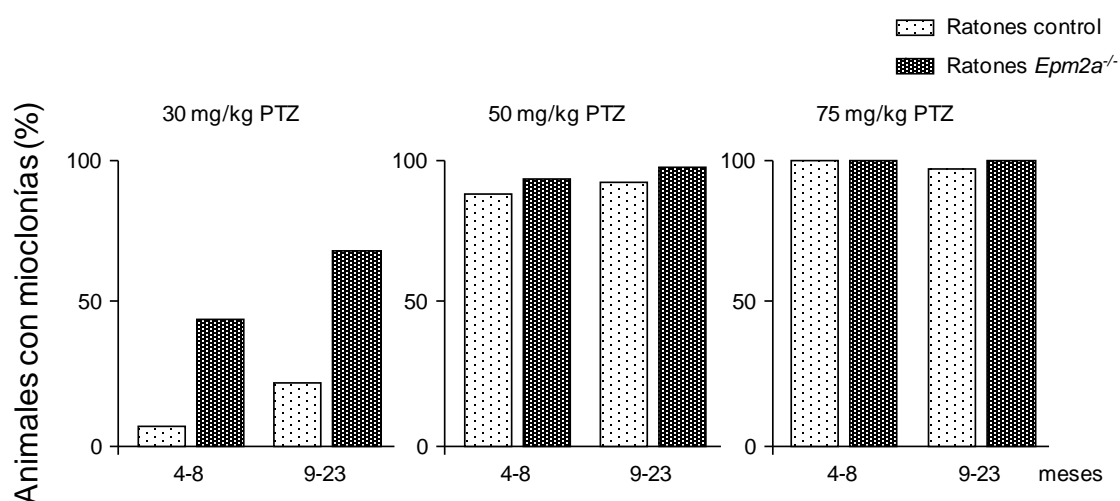


**Figura 18. Actividad electroencefalográfica cortical en ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>.** Ejemplos de la actividad electroencefalográfica de un ratón control de 8 meses de edad (A y B). Descarga de punta-onda que se correspondió con una sacudida muscular en uno de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 4 meses (C). Imagen de tres polipuntas seguidas correspondientes a sacudidas musculares en este mismo ratón (D). Polipunta seguida de crisis tónico-clónica espontánea (E) y crisis tónico-clónica espontánea de 10 seg de duración (F) en un ratón nulo para la expresión de laforina de 16 meses de edad. Registros EEG obtenidos a partir de grabaciones de vídeo-EEG en el equipo Natus Neurowork EEG (Natus Medical Inc., San Carlos, CA. EEUU).

### 1.1.7. Cambios en la sensibilidad al tratamiento con PTZ en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>

El PTZ es un agente epileptógeno que actúa como antagonista del receptor GABA<sub>A</sub> (Stone, 1970). Este agente produce crisis en el 50% de los ratones control a dosis de 50 mg/kg (Shitak et al., 2006). Para los tratamientos con PTZ, tanto los ratones nulos para la expresión de laforina como los ratones control se dividieron en dos grupos de edad, el grupo de 4-8 meses y el de 9-23 meses. Estos grupos se subdividieron a su vez en otros tres grupos a los que se les administraron distintas dosis de PTZ: 30, 50 ó 75 mg/kg. Tras la inyección de la droga epileptógena se analizó el porcentaje de ratones que presentó mioclonías (Fig. 19) y crisis epilépticas (Fig. 20) a las distintas dosis de PTZ. También se analizó la letalidad producida por este agente epileptógeno (Fig. 21).

Con dosis de 30 mg/kg de PTZ, el 45% de los ratones de 4-8 meses y el 67% de los ratones de 9-23 meses de edad nulos para la expresión de laforina, tuvieron mioclonías, mientras que en los ratones control sólo un pequeño porcentaje de los mismos las manifestó, siendo el grupo de mayor edad el que presentó una mayor proporción, que alcanzó el 22%. Con 50 mg/kg, los porcentajes de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y ratones control que presentaron mioclonías fueron bastante similares, alcanzando el 100% en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 9-23 meses de edad. A dosis de 75 mg/kg de PTZ, prácticamente todos los ratones, tanto mutantes para laforina como control de todos los grupos de edad, tuvieron mioclonías, (Fig. 19). Así, la ausencia de expresión de laforina produce una disminución del umbral de aparición de mioclonías con el agente epileptógeno PTZ a todas las dosis, más pronunciada a la dosis menor.

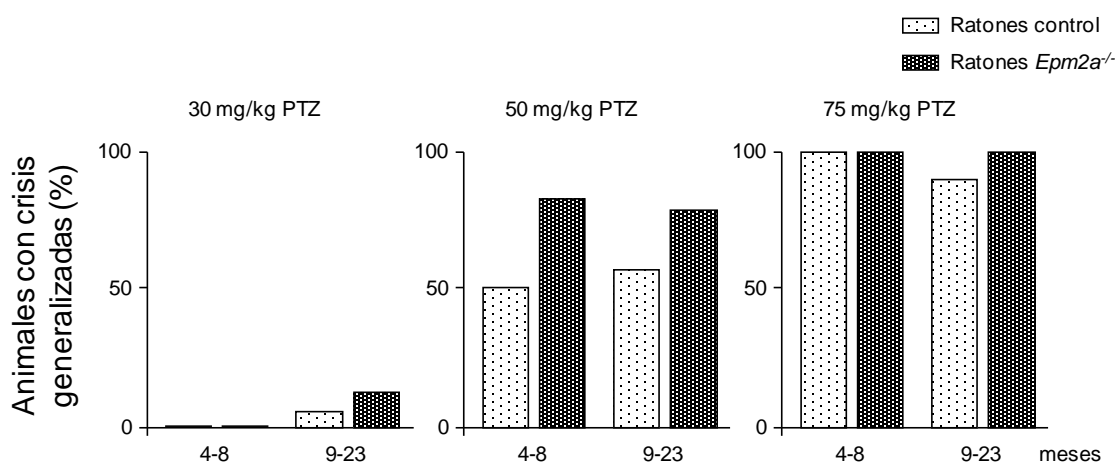


**Figura 19. Porcentaje de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> que presentaron mioclonías a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg de PTZ.** A pequeñas dosis de PTZ (30 mg/kg) más del 40% de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> presentó mioclonías mientras que sólo se observaron en una pequeña proporción de los grupos control (22% de los ratones de 9-23 meses de edad). Con 50 mg/kg de PTZ, los porcentajes de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y controles que presentaron mioclonías fueron bastante similares, alcanzando el 100% a los 9-23 meses de edad. Con dosis de 75 mg/kg de PTZ, prácticamente todos los ratones presentaron mioclonías (n = 18-38).

Con respecto a la manifestación de crisis epilépticas, un bajo porcentaje de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y ratones control de 9-23 meses de edad sufrieron crisis epilépticas al ser tratados con 30 mg/kg de PTZ, alcanzando el 13% el grupo de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 9-23 meses de edad frente al 6% de los controles. Con dosis de 50 mg/kg de PTZ, más del 80% de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de todas las edades presentaron crisis epilépticas, mientras que el porcentaje de los ratones control se situó en torno al 50%. Con dosis de

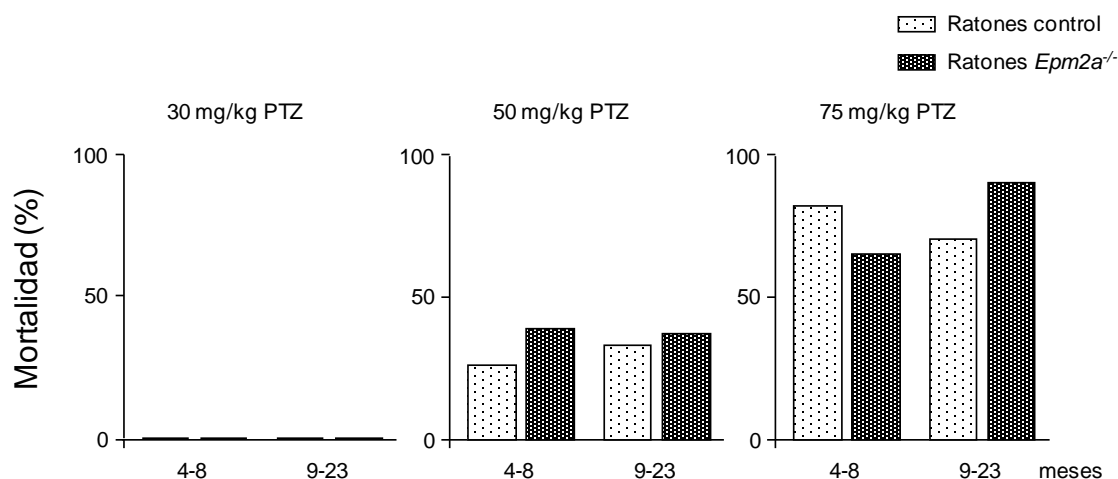


75 mg/kg, todos los ratones tanto nulos para la expresión de laforina como los controles sufrieron crisis epilépticas, exceptuando el grupo control de 9-23 meses de edad, en el que sólo el 90% de los ratones presentaron crisis (Fig.20). Así, la ausencia de expresión de laforina produce también una disminución del umbral de aparición de crisis epilépticas con el agente epileptógeno PTZ a dosis de 30 y 50 mg/kg, mientras que produce crisis al 100% de los ratones a la dosis de 75 mg/kg.



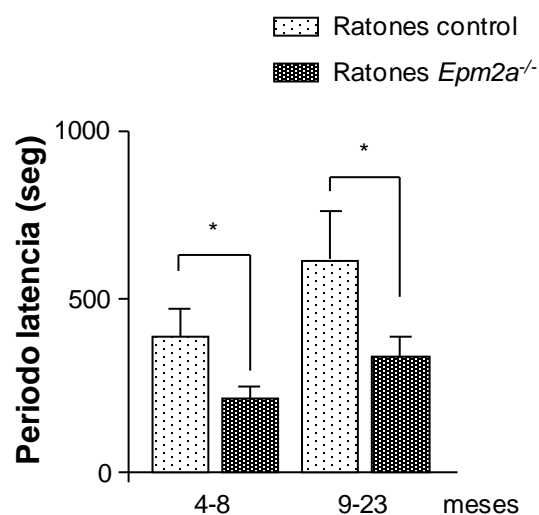
**Figura 20. Porcentaje de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> con crisis generalizadas a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg de PTZ.** A pequeñas dosis de PTZ (30 mg/kg) sólo el 13% de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> presentó crisis epilépticas en el grupo de 9-23 meses de edad. Con 50 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> que presentaron crisis epilépticas superó el 80% en ambos grupos de edad. Con dosis de 75 mg/kg de PTZ, todos los ratones nulos para la expresión de laforina presentaron crisis epilépticas (n = 18-38).

En relación a la letalidad, cuando se trataron los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y los controles con dosis de 30 mg/kg de PTZ, no se observó mortalidad en ninguno de los grupos a diferentes edades. Cuando se inyectaron 50 mg/kg de PTZ, el 40% de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 4-8 meses de edad murió y sólo lo hizo el 25% de los controles a esta misma dosis, mientras que a los 9-23 meses el porcentaje de ratones que murieron con 50 mg/kg de PTZ fue similar en ambos grupos de ratones. Cuando los ratones fueron tratados con 75 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 4-8 meses de edad que murió fue menor que en los ratones control (un 66% frente a un 83%) mientras que en los ratones de 15-23 meses la letalidad alcanzó al 91% de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> frente al 71% de los ratones control (Fig. 21).



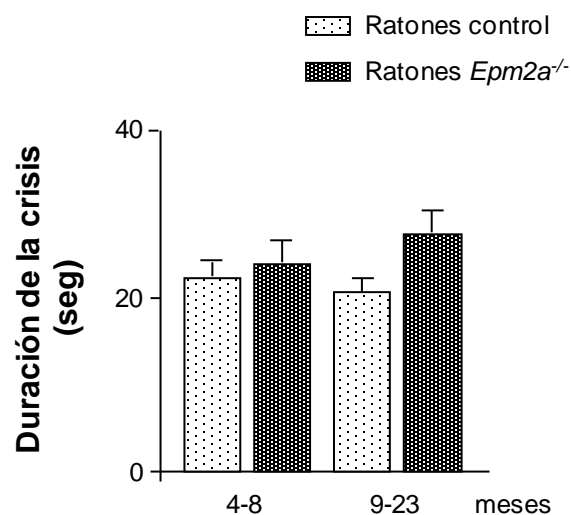
**Figura 21. Letalidad de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg de PTZ.** No se observó mortalidad a dosis de 30 mg/kg de PTZ, ni en ratones nulos para la expresión de laforina ni en ratones control, a ninguna de las edades analizadas (4-8 y 9-23 meses). Con dosis de 50 mg/kg, el porcentaje de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de 4-8 meses de edad que murieron fue superior que al observado en los controles, pero en ratones mayores estos porcentajes se igualaron. Por el contrario, cuando se inyectaron 75 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> del grupo de 4-8 meses de edad que murieron fue menor que el de los ratones control, mientras que en el grupo de 9-23 meses de edad los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> mostraron una mayor sensibilidad a la toxicidad del PTZ (n = 18-38).

En los ratones tratados con 50 mg/kg de PTZ, además, se midió el periodo de latencia o tiempo que tardó el ratón en sufrir una crisis tónico-clónica tras la inyección de PTZ, así como la duración de la misma. Para ello, tanto los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> como los ratones control, se dividieron en dos grupos de edad, 4-8 meses y 9-23 meses (Fig.22 y Fig. 23). El periodo de latencia fue significativamente menor en los ratones nulos para la expresión de laforina que en los ratones control en ambos grupos de edad (Fig. 22).



**Figura 22.** Periodo de latencia desde la inyección de 50 mg/kg de PTZ hasta la aparición de crisis tónico-clónicas en ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>. El tiempo transcurrido desde la administración de PTZ hasta la aparición de las crisis fue significativamente menor en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> que en los ratones control. Los datos se analizaron mediante un test *t-Student*. \* $p < 0.05$  ( $n = 10-22$ ).

Sin embargo, la duración de la crisis fue similar en los ratones mutantes para laforina que en los ratones control, aunque las crisis de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> mostraron una tendencia a ser de mayor duración que las de los animales control (Fig.23).



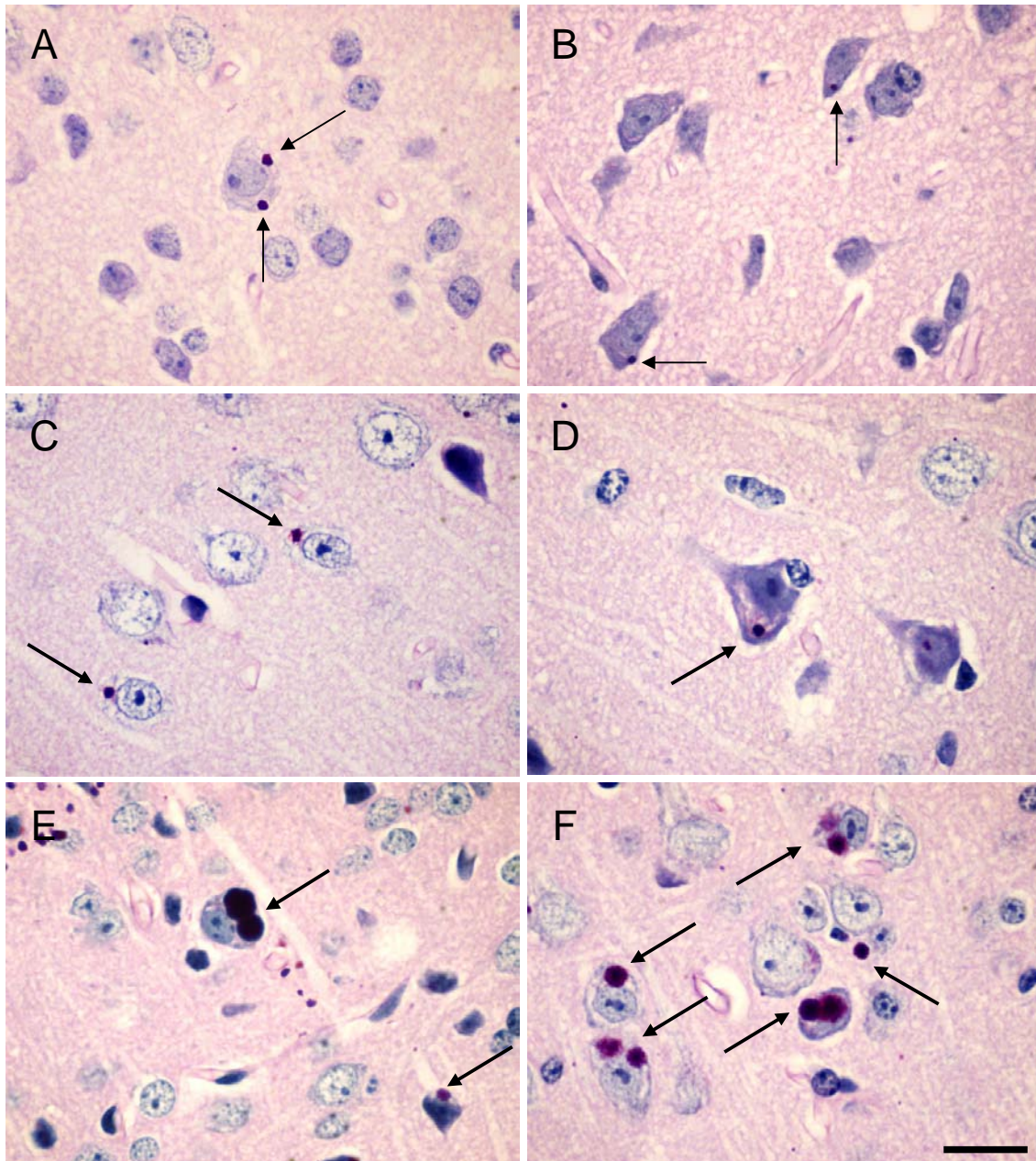
**Figura 23.** Duración de la crisis después de la inyección de 50 mg/kg de PTZ en ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>. La duración de la crisis fue similar en los ratones nulos para la expresión de laforina y los controles, en ambos grupos de edad. Sin embargo, las crisis de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> tendían a ser más largas que las de los ratones control. Los datos se analizaron usando el test *t-Student* ( $n = 10-22$ ).

## 1.2. Ratones nulos para la expresión de la proteína malina

Los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>, nulos para la expresión de la proteína malina, se generaron mediante la eliminación del único exón del gen *Epm2b* (Criado et al., 2011). Los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> se desarrollan normalmente y son fértiles pero manifiestan alteraciones neurológicas y de comportamiento a partir de los 3-6 meses de edad, que se correlacionan con una autofagia alterada y la presencia de numerosos cuerpos de Lafora en corteza cerebral y cerebelo. Estas alteraciones se agravan con la edad, al tiempo que los cuerpos de Lafora se acumulan en diversas regiones del sistema nervioso (Criado et al., 2011).

### 1.2.1. Presencia de cuerpos de Lafora en ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>

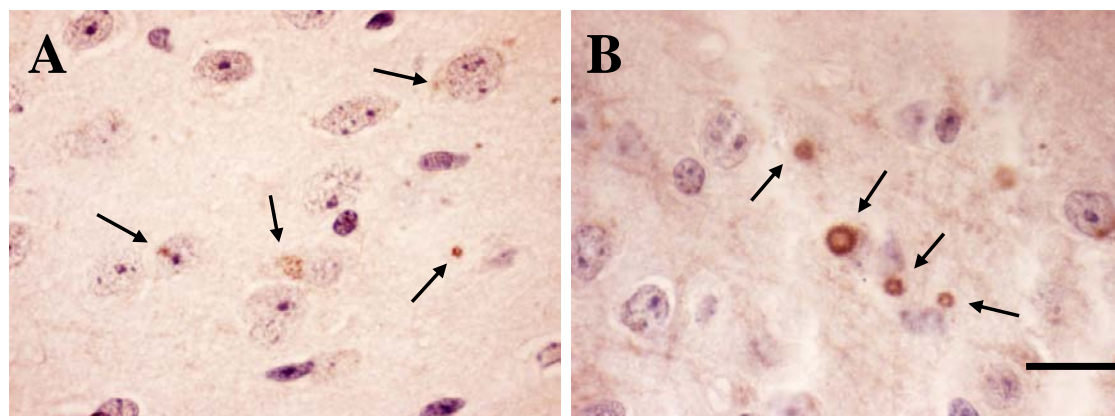
Para determinar la presencia de cuerpos de Lafora en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>, se realizó la tinción de PAS en cortes histológicos a diferentes edades. A los 16 días de edad no se observaron cuerpos de Lafora en ningún tejido analizado (datos no mostrados) (Criado et al., 2011). Sin embargo, los ratones de 3 meses de edad presentaron abundantes acúmulos de cuerpos de Lafora en cerebro, corazón y músculo esquelético y su número y tamaño aumentaba con la edad (Criado et al., 2011). En cerebro, los cuerpos de Lafora eran muy abundantes en el bulbo olfatorio, núcleos basales, núcleo geniculado lateral, cerebelo y núcleos del puente, hipocampo y corteza cerebral, y también presentaban ubiquitina (Criado et al., 2011). Así, por ejemplo, las capas IV (Fig. 24A, C y E) y V (Fig. 24B, D y F) de la corteza cerebral mostraban la presencia de cuerpos de Lafora a 3 meses (Fig. 24A y B) y a 7 meses (Fig. 24C y D) de edad, que eran de menor tamaño y considerablemente menos frecuentes que los presentes en esas mismas capas IV y V de corteza cerebral en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> de 17 meses de edad (Figura 24E y F, respectivamente).



**Figura 24. Cuerpos de Lafora en cerebro de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>.** Inclusiones citoplasmáticas teñidas con la tinción de PAS (flechas) en capas IV (A, C y E) y V (B, D y F) de corteza cerebral en ratones de 3 meses (A y B) en ratones de 7 meses (C y D) y en ratones de 17 meses de edad (E y F). La barra de aumentos corresponde a 22  $\mu$ m.

Además, también se identificaron inclusiones citoplasmáticas que reaccionaban con un anticuerpo dirigido contra ubiquitina en secciones de cerebro adyacentes a las analizadas en la figura anterior. Así, a los 7 meses de edad, se observaron abundantes estructuras intracelulares de pequeño tamaño identificadas con este anticuerpo frente a ubiquitina (Fig. 25A), muy similares a los cuerpos de Lafora teñidos con PAS (Fig. 24). En secciones de cerebro de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> de 17 meses de edad se encontraron

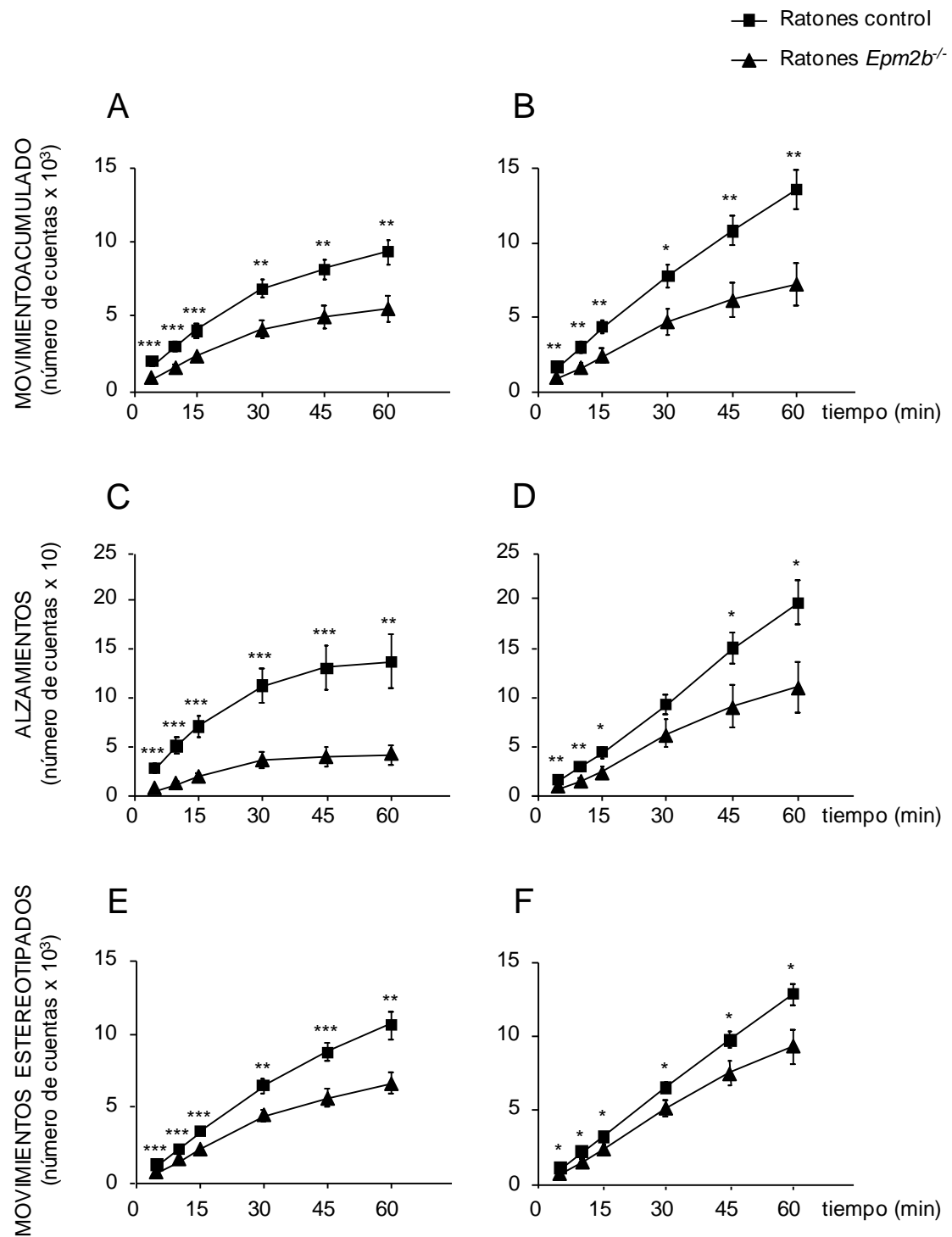
numerosas inclusiones intracelulares con el anticuerpo frente a ubiquitina, de mayor tamaño y con un centro claro y un marcaje periférico muy denso (Fig. 25B). Estas inclusiones coinciden en su localización con la de los cuerpos de Lafora, aunque son menos frecuentes (Fig. 24).



**Figura 25. Presencia de ubiquitina en la corteza cerebral de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>.** La figura muestra inclusiones intracelulares presentes en capa V de corteza cerebral identificadas con el anticuerpo dirigido contra ubiquitina (flechas) en ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> de 7 meses (A) y de 17 meses de edad (B). Estas estructuras son muy similares a las identificadas con la tinción de PAS en la corteza cerebral de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> a las mismas edades, aunque en el caso de la ubiquitina, estas inclusiones citoplasmáticas son menos frecuentes. La barra de aumentos corresponde a 22  $\mu$ m.

### 1.2.2. Alteraciones de la actividad motora en los ratones deficientes para la expresión de malina

Del mismo modo que para el modelo *Epm2a*<sup>-/-</sup>, nulo para la expresión de la proteína laforina, se empleó el actímetro para estudiar la actividad locomotora y exploratoria espontáneas de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>. Para este estudio, se utilizaron ratones jóvenes (4-8 meses) y adultos (9-15 meses) tanto controles como nulos para la expresión de malina (Fig. 26). Los ratones de 4-8 meses de edad nulos para la expresión de la proteína malina mostraron un descenso significativo a lo largo del tiempo en sus movimientos superficiales, alzamientos y estereotipados (Fig. 26A, C y E) con respecto a los ratones control. Igualmente, en el caso de los ratones nulos para la expresión de malina de 9-15 meses de edad, la cantidad de movimientos superficiales, alzamientos y estereotipados (Fig. 26B, D y F) resultó ser significativamente inferior al ser comparados con los ratones control, aunque estas diferencias no fueron tan marcadas como en el grupo de animales jóvenes.



**Figura 26. Actividad locomotora espontánea y actividad exploratoria de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>.** En la gráfica, se muestra el número de cuentas obtenidas en el actímetro a partir de los movimientos de desplazamiento (A y B) de alzamientos (C y D) y estereotipados (E y F) llevados a cabo a los 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min en ratones de 4-8 (A, C y E) y de 9-15 (B, D y F) meses de edad. Los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> mostraron una reducción de la cantidad de movimientos acumulado, de alzamientos y estereotipados en todas las edades con respecto a los ratones control, siendo significativamente más marcado este descenso



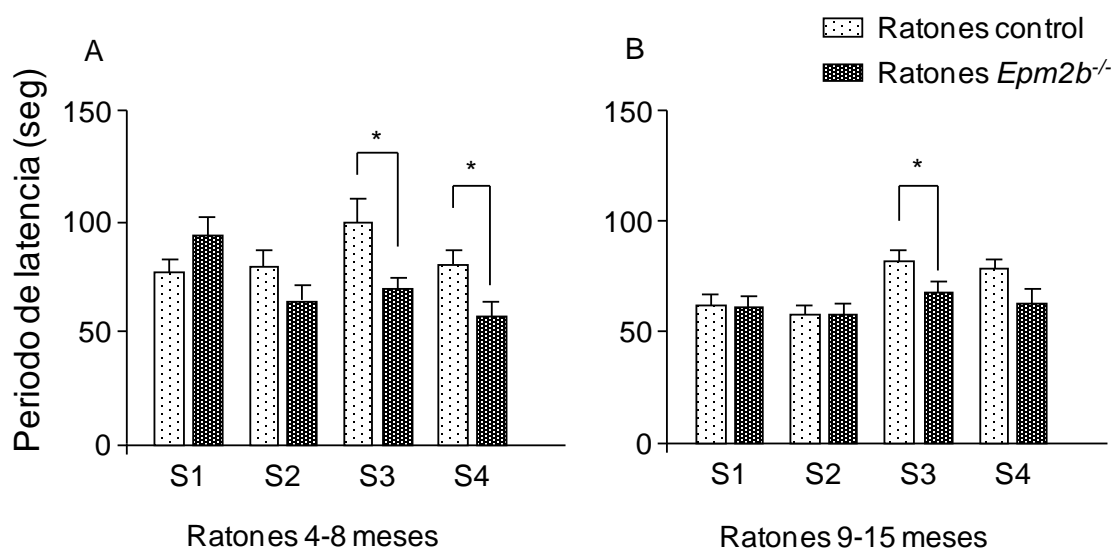
en los ratones de menor edad. Los datos se analizaron usando un test *t-Student*. Los valores se representaron como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (n = 11-16).

### **1.2.3. Alteraciones de la coordinación motora y del equilibrio en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>**

Al igual que en el caso de los ratones nulos para la expresión de la proteína laforina, para analizar las posibles alteraciones en la coordinación motora y el equilibrio de los ratones en ausencia de expresión de la proteína malina, se realizó el test de rotarod. El periodo de latencia, tiempo que tardaron los ratones en soltarse del rodillo del rotarod cuando éste rotaba con aceleración constante, se midió en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> y en los ratones control en dos grupos de edad: ratones de 4-8 y de 9-15 meses, en cuatro sesiones, S1 y S2 el primer día del test y S3 y S4 el segundo día (Fig. 27). A los 4-8 meses de edad, los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> mostraron un periodo de latencia significativamente menor que los controles en las sesiones 3-4 (S3-S4) del segundo día (Fig. 27A). En el grupo de ratones de 9-15 meses de edad, los ratones nulos para la expresión de malina y los ratones control tuvieron un periodo de latencia similar el primer día del test (S1 y S2) mientras que el segundo día del test el resultado fue inverso, los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> presentaron un menor tiempo de permanencia sobre el rodillo del rotarod que los ratones control (Fig. 27B) encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la tercera sesión (S3).

Como sucedía en el caso de los ratones nulos para la expresión de la proteína laforina, estos resultados indican que la ausencia de expresión de malina producía una alteración significativa en la coordinación motora, hecho que se reflejó en una reducción del tiempo que los ratones mutantes fueron capaces de mantenerse sobre el rodillo del rotarod cuando éste rotaba con una aceleración constante.



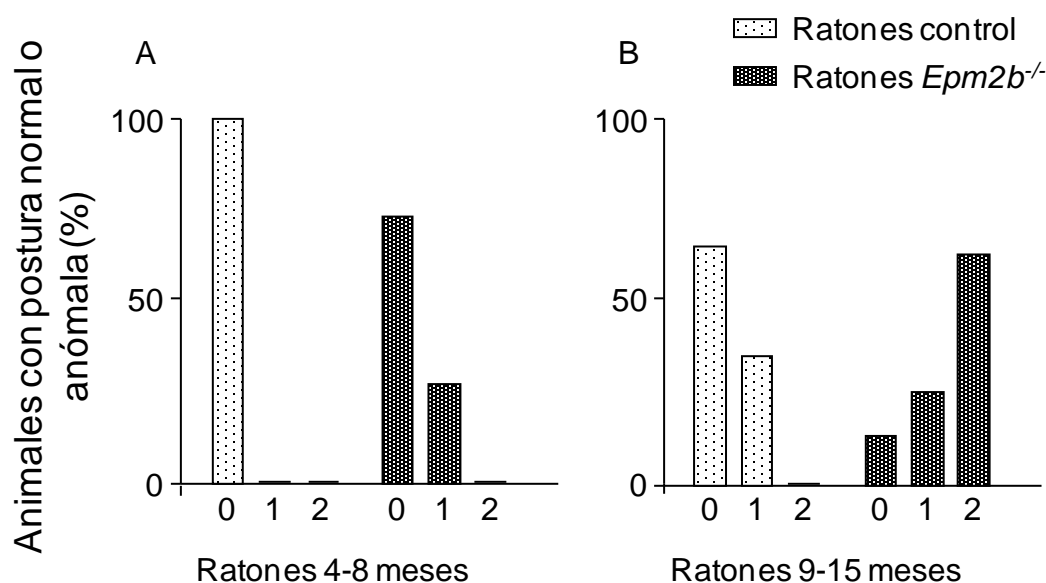


**Figura 27. Análisis de la coordinación motora y equilibrio de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> realizado con el test del rotarod.** El tiempo que tardaron en desprenderse del rodillo del rotarod cuando éste rotaba con aceleración constante (periodo de latencia) se representó a los 4–8 meses (A) y a los 9–15 meses (B) de edad, tanto en ratones control como en mutantes en dos sesiones diarias (S1-S2 el primer día y S3-S4 el segundo día). La latencia media de permanencia en el rodillo del rotarod fue significativamente menor en los ratones nulos para la expresión de malina que en los ratones control en las sesiones 3-4 a los 4-8 meses de edad y en la sesión 3 a los 9-15 meses. Los datos se analizaron usando el test *t-Student*. \* $p < 0.05$  ( $n = 12-16$ ).

#### 1.2.4. Discinesias y posturas anormales en el test de suspensión de la cola

Se analizaron las alteraciones neurológicas provocadas por la ausencia de malina mediante el test de suspensión de la cola (Carter et al., 1999; Fernagut et al., 2002; Reddy et al., 1998) distribuyendo a los ratones en los correspondientes grupos de edad, ratones jóvenes (4-8 meses) y ratones adultos (9-15 meses) (Fig. 28). A los 4-8 meses de edad, un 27% de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> mostraron una leve discinesia, clasificada con nivel “1”, que se reflejaba en una flexión irregular y extensión de las patas posteriores de forma intermitente, mientras que ninguno de los animales control manifestaron una postura anormal (Fig. 28A). En el grupo de ratones de 9-15 meses de edad, sólo un 13% de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> mostraron una postura normal (nivel “0”), un 25% mostraron leves discinesias y posturas anormales (nivel “1”) mientras que más de un 63% presentaron las patas traseras permanentemente dobladas hacia el abdomen (alteraciones clasificadas como nivel “2”) (Fig. 28B). En el caso de los ratones control, también el

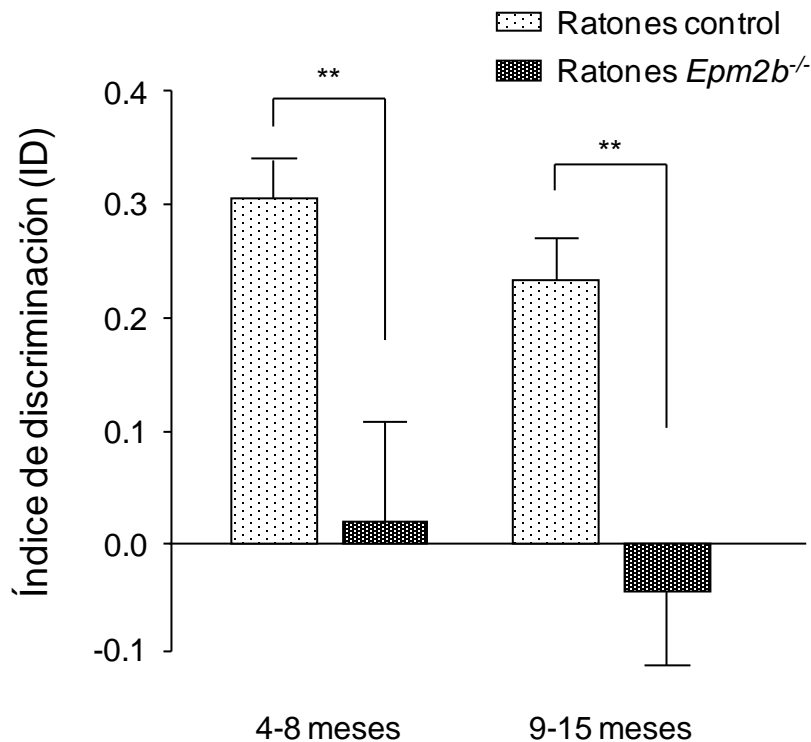
65% de los ratones mostraron una postura normal y el 35% mostraron alteraciones de valor “1” (Fig. 28B) probablemente debidas a problemas asociados con la edad.



**Figura 28. Estudio de las discenesias y posturas anormales en ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> empleando el test de suspensión de la cola.** La figura muestra el porcentaje de animales de 4-8 (A) y de 9-15 (B) meses de edad que mostraron una postura normal o anormal cuando se les suspendió por la mitad de la cola. Se asignó nivel “0” cuando las patas traseras estaban completamente estiradas, indicando postura normal; nivel “1” si el animal encogía intermitentemente una o las dos patas; y nivel “2” cuando ambas patas traseras estaban completamente pegadas al abdomen (n = 8-16).

### 1.2.5. Déficit de la memoria episódica en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>

Se empleó el test de reconocimiento de objetos para el análisis de la memoria a corto plazo, distribuyendo a los ratones en dos grupos de edad, ratones jóvenes (4-8 meses) y ratones adultos (9-15 meses) (Fig. 29). Los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> de 4-8 meses de edad mostraron un ID significativamente menor que el de los animales control, con un valor muy próximo a 0, lo que indicaría que los ratones carentes de malina apenas discriminan entre ambos objetos (Fig. 29). A la edad de 9-15 meses, los ratones nulos para la expresión de malina manifestaron un ID con un valor negativo indicando que los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> no fueron capaces de reconocer y discriminar el objeto antiguo del objeto nuevo (Fig. 29). Estos resultados revelan que la ausencia de expresión de la proteína malina tanto en ratones jóvenes como en ratones adultos produce una deficiencia en la memoria episódica o memoria a corto plazo.



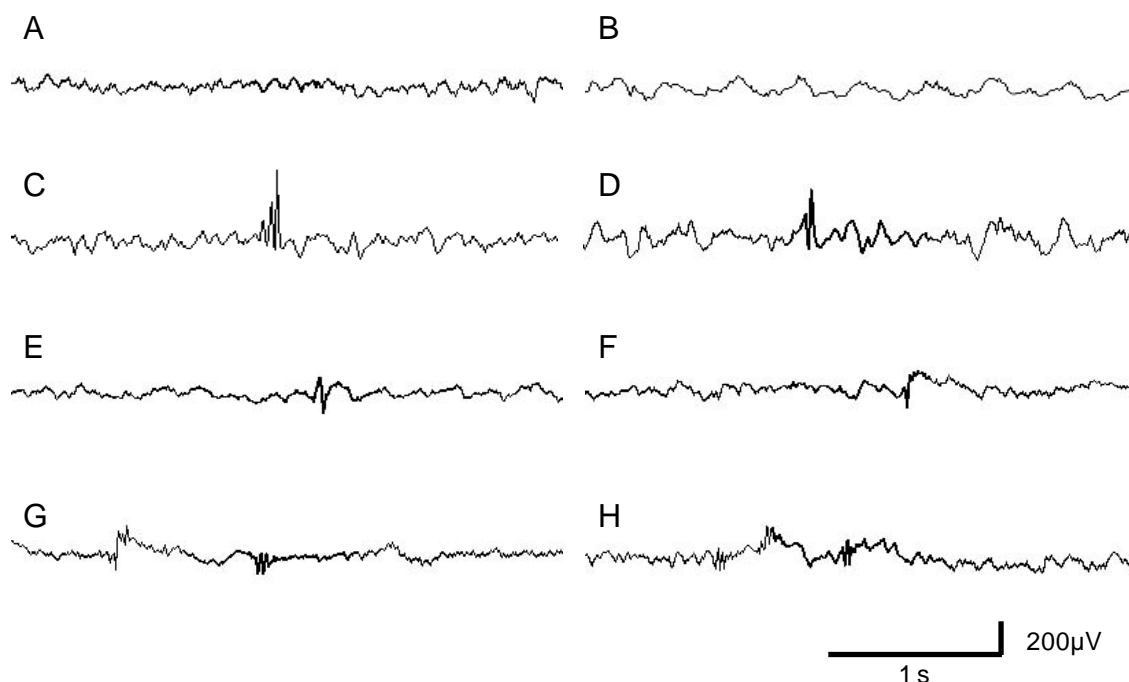
**Figura 29. Análisis de memoria a corto plazo de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> mediante el test de reconocimiento de objetos.** Los ratones se dividieron en dos grupos de edad, ratones jóvenes (4-8 meses) y adultos (9-15 meses). El índice de discriminación (ID) se calculó como la razón entre la diferencia del tiempo de exploración de un objeto nuevo (*t*C) y uno conocido (*t*A) y el tiempo total de exploración (*t*T = *t*A+*t*C) ( $ID = (tC - tA) / tT$ ). Los datos se analizaron mediante un test *t-Student*. \*\**p*<0.01 (n = 11-16).

### 1.2.6. Actividad electroencefalográfica cortical de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>

Para analizar las posibles alteraciones en la actividad electroencefalográfica de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>, se realizaron registros con un equipo de vídeo-EEG computerizado. Se implantaron dos electrodos registradores corticales delante de la línea de Bregma (Fig. 10C) y tras la línea de Lambda, un electrodo de referencia y otro de tierra (Fig. 10D). Transcurridos tres días desde la operación, se procedió al registro de vídeo y de la actividad electroencefalográfica en situación basal de los ratones control y *Epm2b*<sup>-/-</sup> (Fig. 30).

Los ratones control presentan una actividad de fondo basal a 6-7 Hz (Buzsaki, 2002) (Fig. 30A y B). El análisis de los registros y los vídeos mostró que los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> a partir de los 3 meses de edad presentaban mioclonías que se reflejaban en el registro electroencefalográfico como complejos de polipunta-onda (Fig. 30C). Además, se comprobó que los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> presentaban mioclonías espontáneas que se

reflejaban en el registro electroencefalográfico como punta (Fig. 30D), punta-onda (Fig. 30E-F) y polipuntas (Fig. 30G-H) y que en el video se correspondían con sacudidas musculares. Así mismo, los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> manifestaban crisis epilépticas espontáneas sin correlato en el EEG.

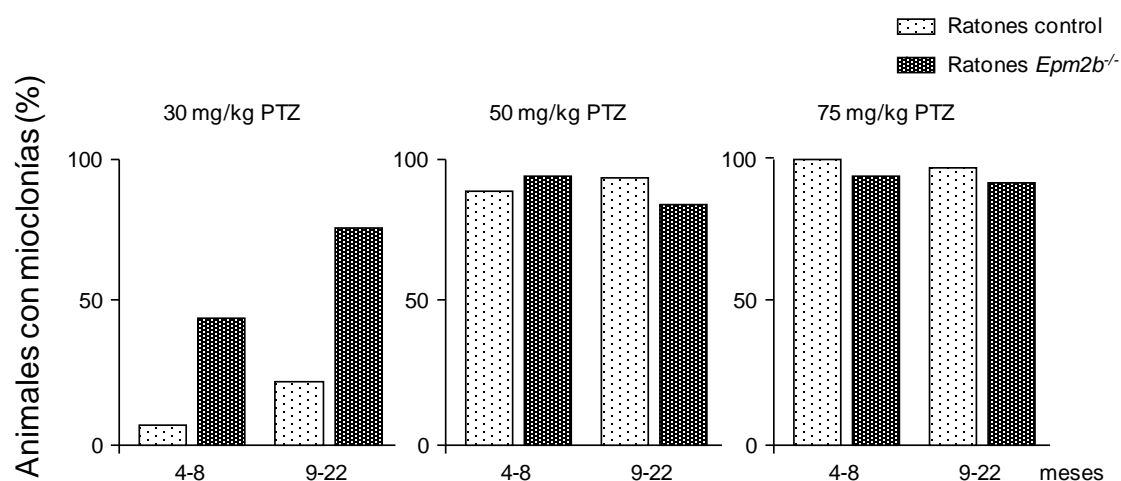


**Figura 30. Actividad electroencefalográfica cortical en ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>.** Ejemplos de la actividad electroencefalográfica de un ratón control (A y B), descarga de polipunta-onda en un ratón *Epm2b*<sup>-/-</sup> de 3 meses de edad (C), punta (D) y punta-onda espontáneas (E-F) correspondientes a sacudidas musculares en un ratón *Epm2b*<sup>-/-</sup> de 19 meses de edad. Polipuntas espontáneas correspondientes a sacudidas musculares en un ratón *Epm2b*<sup>-/-</sup> de 18 meses de edad (G-H). Registros EEG obtenidos a partir de grabaciones de vídeo-EEG en el equipo Natus Neurowork EEG (Natus Medical Inc., San Carlos, CA. EEUU).

### 1.2.7. Cambios en la sensibilidad al tratamiento con PTZ en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>

Para los tratamientos con el agente químico epileptógeno PTZ, se dividieron tanto los ratones mutantes para malina como los ratones control en dos grupos de edad, 4-8 meses y 9-22 meses de edad, los cuales a su vez, se subdividieron en otros tres grupos a los que se administraron distintas dosis de PTZ, 30, 50 ó 75 mg/kg. Se analizó el número de ratones que sufrieron sacudidas musculares (Fig. 31), que manifestaron crisis epilépticas tónico-clónicas (Fig. 32), así como la letalidad de los mismos con el tratamiento de PTZ (Fig. 33).

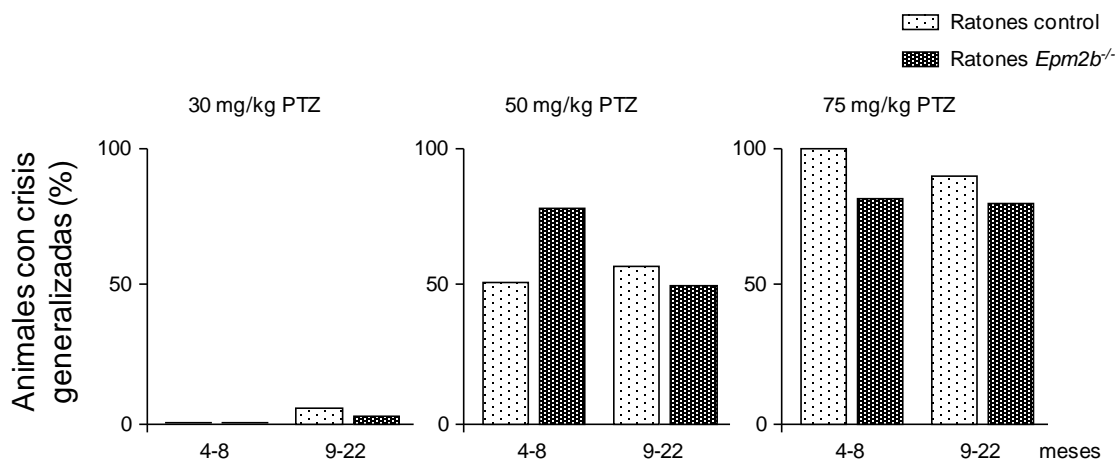
Con dosis de 30 mg/kg de PTZ, aproximadamente el 50% de los ratones de 4-8 meses y el 75% de los ratones de 9-22 meses de edad, nulos para la expresión de malina, presentaron mioclonías, mientras que sólo se observaron en un pequeño porcentaje de los ratones control (22% de los ratones de 9-22 meses de edad). Con 50 mg/kg de PTZ, el porcentaje de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que manifestaron sacudidas musculares fue similar al comparar con los ratones control (en torno al 85%). Al administrar 75 mg/kg de PTZ, prácticamente todos los ratones analizados tuvieron mioclonías (Fig. 31). Así, la ausencia de expresión de malina en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> sólo parece interferir en la sensibilidad al PTZ para producir mioclonías a bajas dosis del agente.



**Figura 31. Porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que presentaron mioclonías a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg de PTZ.** A dosis de 30 mg/kg PTZ, aproximadamente el 50% del grupo más joven de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> presentaron mioclonías, mientras que en el grupo de 9-22 meses de edad el porcentaje se aproximó al 75%. Sólo un 22% de los ratones de 9-22 meses de edad de los ratones control presentaron mioclonías con esta misma dosis de PTZ. Con 50 mg/kg de PTZ, los porcentajes de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> y controles que presentaron mioclonías fueron muy similares, aproximándose al 85%, mientras que con dosis de 75 mg/kg de PTZ prácticamente todos los ratones presentaron mioclonías (n = 16-38).

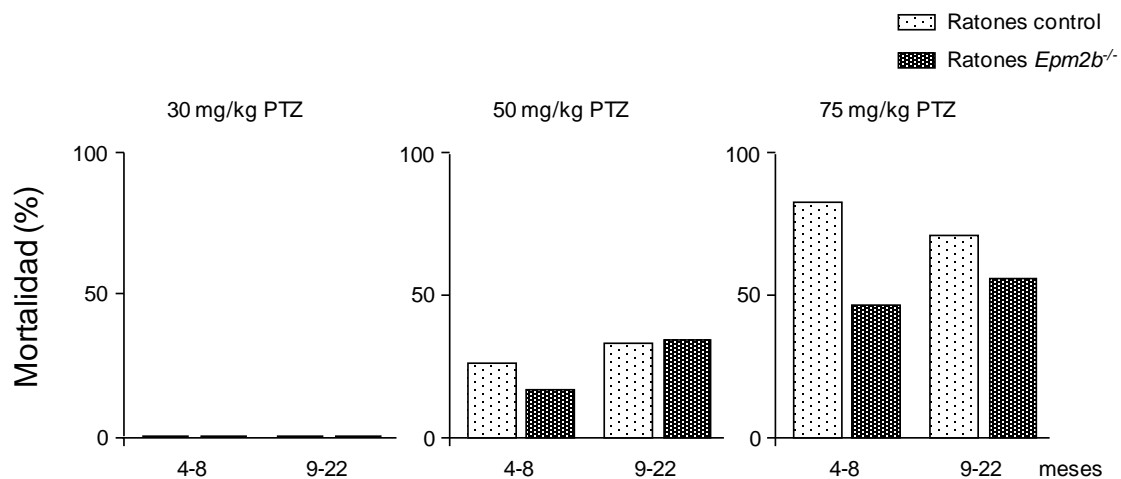
En cuanto a la aparición de crisis epilépticas, con dosis de 30 mg/kg de PTZ, sólo un pequeño porcentaje de ratones control a 9-22 meses (6%) y de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> (3%) presentaron crisis epilépticas. Al administrar 50 mg/kg de PTZ en el grupo de 4-8 meses de edad, el porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que sufrieron crisis epilépticas fue mayor (78%) al compararlo con los controles (50%), pero esta diferencia se igualó en el otro grupo de mayor edad. Igualmente, con dosis de 75 mg/kg de PTZ a todas las edades, el porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que sufrieron crisis epilépticas fue parecido o

un poco inferior que en los ratones control (Fig. 32). Así, la ausencia de expresión de malina tampoco parece influir en la sensibilidad de los ratones al PTZ para producir crisis epilépticas, con excepción del grupo más joven a la dosis intermedia y, en todo caso, parece que disminuye el porcentaje de crisis que produce a las dosis más altas.



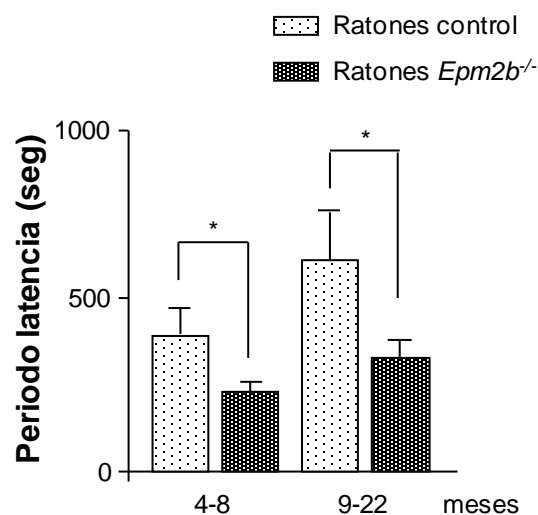
**Figura 32. Porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> con crisis generalizadas a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg de PTZ.** Al administrar 30 mg/kg de PTZ, sólo el 3% de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> presentó crisis epilépticas en el grupo de 9-22 meses de edad. Con 50 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que presentaron crisis epilépticas, se situó en el 78% en los grupos de 4-8 meses de edad mientras que disminuyó al 50% en el grupo de mayor edad. Al inyectar 75 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones nulos para la expresión de malina que presentaron crisis epilépticas fue algo menor que en los animales control (n = 16-38).

En cuanto a la letalidad, al administrar 30 mg/kg de PTZ no se observó mortalidad en ninguno de los ratones analizados. Con dosis de 50 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> y de ratones control que murió a todas las edades fue muy similar, mientras que con dosis de 75 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que murió fue menor que el de los ratones control (Fig. 33). Estos resultados indican de nuevo que la falta de expresión de malina produce ciertas alteraciones en la sensibilidad al agente PTZ, pero al contrario de lo que ocurría al eliminar la expresión de laforina, aumentando ligeramente la resistencia a la toxicidad del mismo a las dosis superiores.



**Figura 33. Letalidad de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> con tratamientos de PTZ a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg.** En los distintos grupos de edad (4-8 y 9-22 meses) no se observó mortalidad a dosis de 30 mg/kg de PTZ, ni en ratones nulos para la expresión de malina ni en ratones control. Con dosis de 50 mg/kg, el porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que murieron fue ligeramente inferior que en los grupos control. Sin embargo, cuando se inyectaron 75 mg/kg, el porcentaje de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que murieron fue considerablemente menor que en los animales control (n = 16-38).

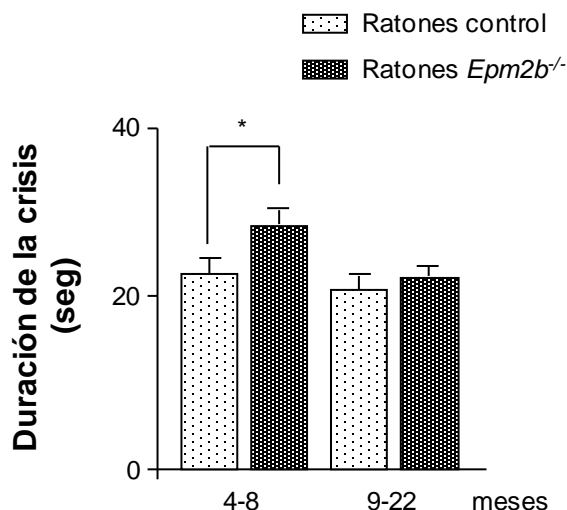
También se analizó el periodo de latencia tras la inyección de 50 mg/kg de PTZ hasta sufrir una crisis tónico-clónica y la duración de la misma. Para ello, se analizaron los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> y los ratones control en dos grupos de edad, 4-8 meses y 9-22 meses (Fig.34 y Fig. 35). El periodo de latencia fue significativamente menor en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que en los control en ambos grupos de edad (Fig.34).



**Figura 34. Periodo de latencia desde la inyección de 50 mg/kg de PTZ hasta la aparición de crisis tónico-clónicas en ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>.** El tiempo transcurrido desde la inyección de PTZ hasta la aparición

de las crisis en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> de ambos grupos de edad fue significativamente menor que en los animales control. Los datos se analizaron mediante un test *t-Student*. \**p*<0.05 (n = 10-20).

Además, la duración de las crisis fue estadísticamente mayor en los ratones mutantes para malina que en los ratones control en el grupo de 4-8 meses de edad. Esta tendencia se mantuvo en el grupo de 9-22 meses pero, en este caso, no se encontraron diferencias significativas (Fig.35).



**Figura 35. Duración de la crisis después de la inyección de 50 mg/kg de PTZ en ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>.** La duración de las crisis fue significativamente mayor en los ratones nulos para la expresión de malina que en los ratones control en el grupo de 4-8 meses edad. Sin embargo, la duración de las crisis de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> de 9-22 meses de edad fueron similares a las de los ratones control. Los datos se analizaron usando el test *t-Student*. \**p*< 0.05 (n = 10-20).

Así, mientras que el porcentaje de animales deficientes para la expresión de malina que presentaban crisis epilépticas no era mucho mayor que los ratones control, exceptuando el grupo joven a 50 mg/kg, el periodo de latencia hasta la aparición de las crisis es considerablemente menor y la duración de las mismas, un poco mayor.

## 2. Modelo de demencia frontotemporal: ratones *Tau*<sup>VLW</sup>, transgénicos de la proteína tau humana con mutaciones de FTDP-17

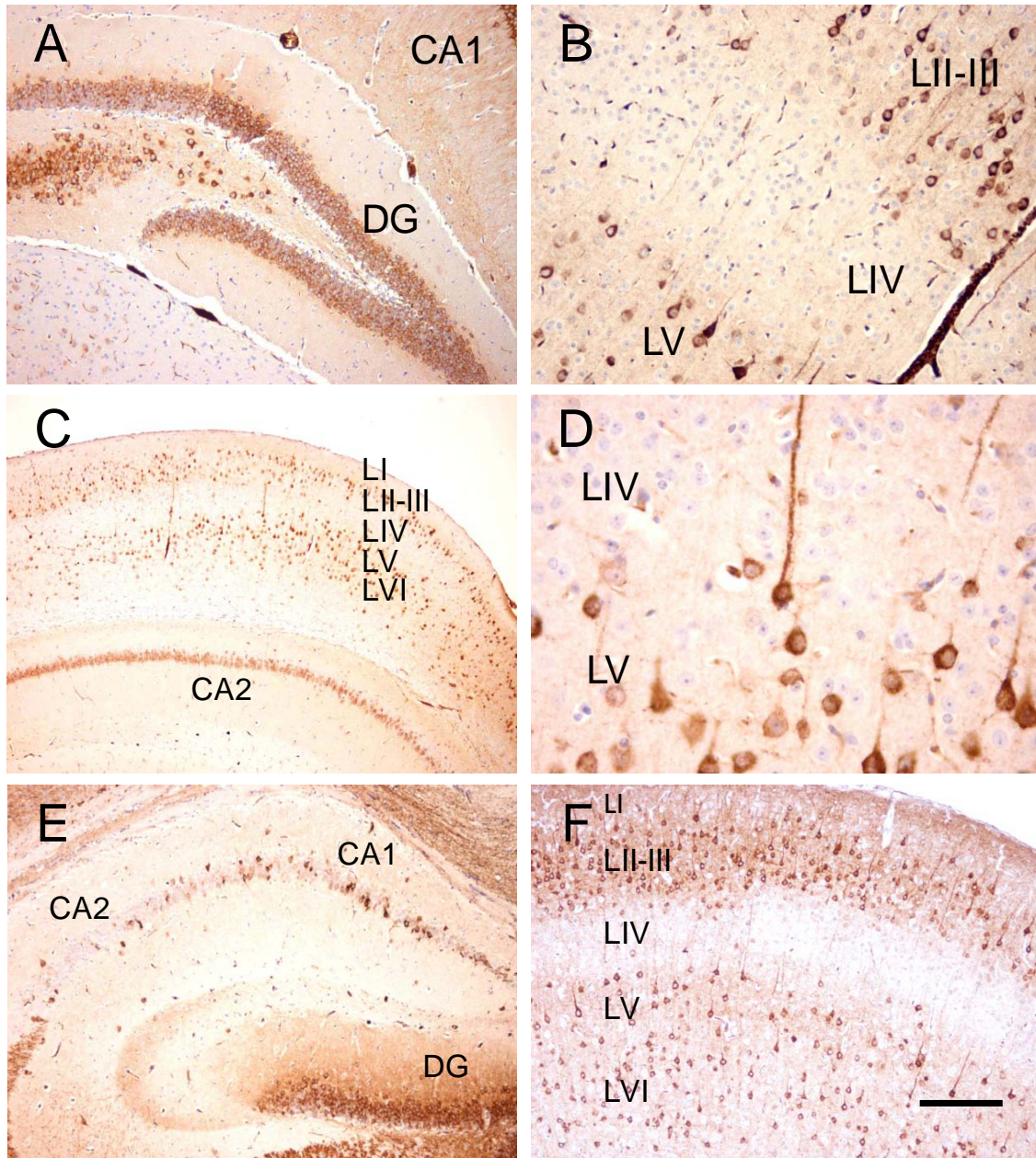
Los ratones transgénicos de tau analizados en este trabajo (ratones *Tau*<sup>VLW</sup>) sobre-expresan una isoforma de la proteína tau humana con dos insertos en la región amino-terminal, con cuatro repeticiones en el dominio de unión a tubulina y con tres de las mutaciones características de la FTDP-17, G272V, P301L y R406W (hTauVLW) bajo el control del promotor específico neuronal Thy-1 (Lim et al., 2001). En este



trabajo, en primer lugar se confirmó la expresión del transgen hTauVLW y de agregados de la proteína tau hiperfosforilada en los ratones  $Tau^{VLW}$  para, posteriormente, analizar la actividad electroencefalográfica de estos ratones con vídeo-EEG monitorizado y evaluar su respuesta a diferentes tratamientos de PTZ.

## **2.1. Expresión del transgen hTauVLW en el cerebro de los ratones $Tau^{VLW}$**

En primer lugar, se analizó la presencia del transgen hTauVLW en los ratones  $Tau^{VLW}$  con el anticuerpo T14, dirigido contra un epítipo específico presente en la proteína tau humana y se observó que su expresión era abundante en varias regiones del cerebro, entre ellas en la corteza cerebral e hipocampo (Fig. 36), la sustancia *nigra*, núcleos talámicos, el *locus coeruleus*, núcleos del cerebelo y en núcleos ventrales de la médula espinal (Guerrero et al., 2008; Guerrero et al., 2009; Lim et al., 2001).

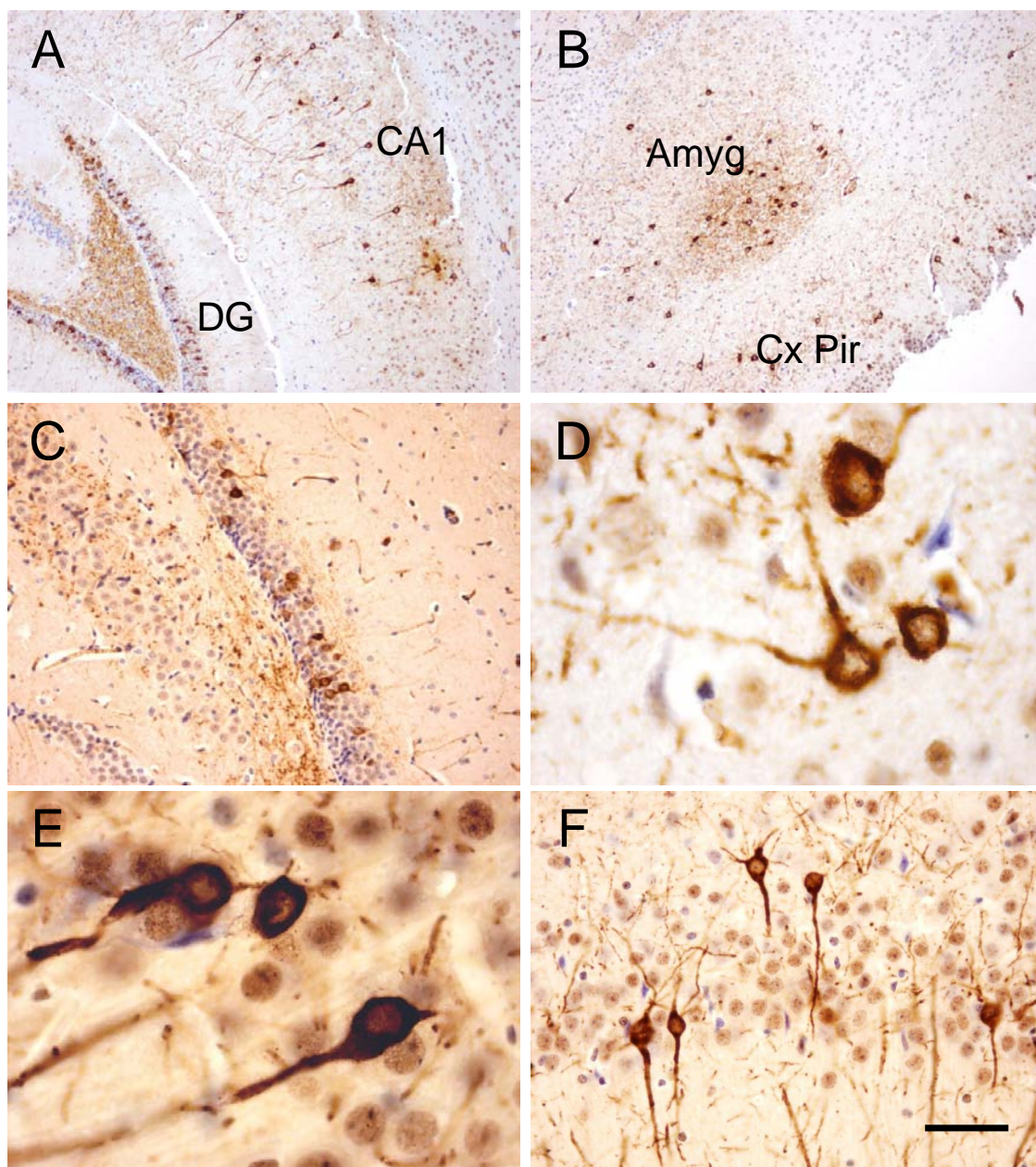


**Figura 36. Expresión del transgen hTauVLW en hipocampo y corteza cerebral de los ratones *Tau<sup>VLW</sup>* a 3 (A y B), 9 (C y D) y 19 (E y F) meses de edad.** Las neuronas piramidales del hipocampo (CA1 en A y E y CA2 en C y E) así como las granulares del giro dentado (DG) (A y E) presentan tinción con el anticuerpo T14, específico de un epítipo presente en la proteína tau humana. También las neuronas piramidales corticales de capas II-III, V y VI (B, D y F) expresan el transgen con la isoforma de tau humana mutada. LI-LVI: capas I a VI de corteza cerebral; CA: Cuerno de Amón; DG: Giro dentado. La barra en A, E, F corresponde a 132  $\mu$ m, en C a 198  $\mu$ m, en B a 62  $\mu$ m y en D a 34  $\mu$ m.

## **2.2. Presencia de agregados de tau hiperfosforilado en el cerebro de los ratones *Tau*<sup>VLW</sup>**

Los ratones *Tau*<sup>VLW</sup> mostraban agregados anómalos de la proteína tau en las regiones donde se sobre-expresaba el transgen hTauVLW a partir de los 18 meses de edad. Estos agregados se identificaron con anticuerpos dirigidos contra epítomos fosforilados de tau (Engel et al., 2006; Guerrero et al., 2008; Guerrero et al., 2009; Lim et al., 2001; Perez et al., 2005). En este trabajo se utilizó el anticuerpo AT8, dirigido contra la Ser202 fosforilada que se localiza en una región rica en prolinas de la proteína tau. La corteza cerebral y el hipocampo mostraban agregados de la proteína tau hiperfosforilada (Fig. 37) en neuronas piramidales del hipocampo (CA1 en Fig. 37A y E, CA2 en Fig. 37F) y en neuronas granulares del giro dentado (Fig. 37A y C). También se encontraron agregados de la proteína tau identificados con el anticuerpo AT8 en neuronas del núcleo de la amígdala (Amyg, Fig. 37B) y en la corteza piriforme (Fig. 37B y D).





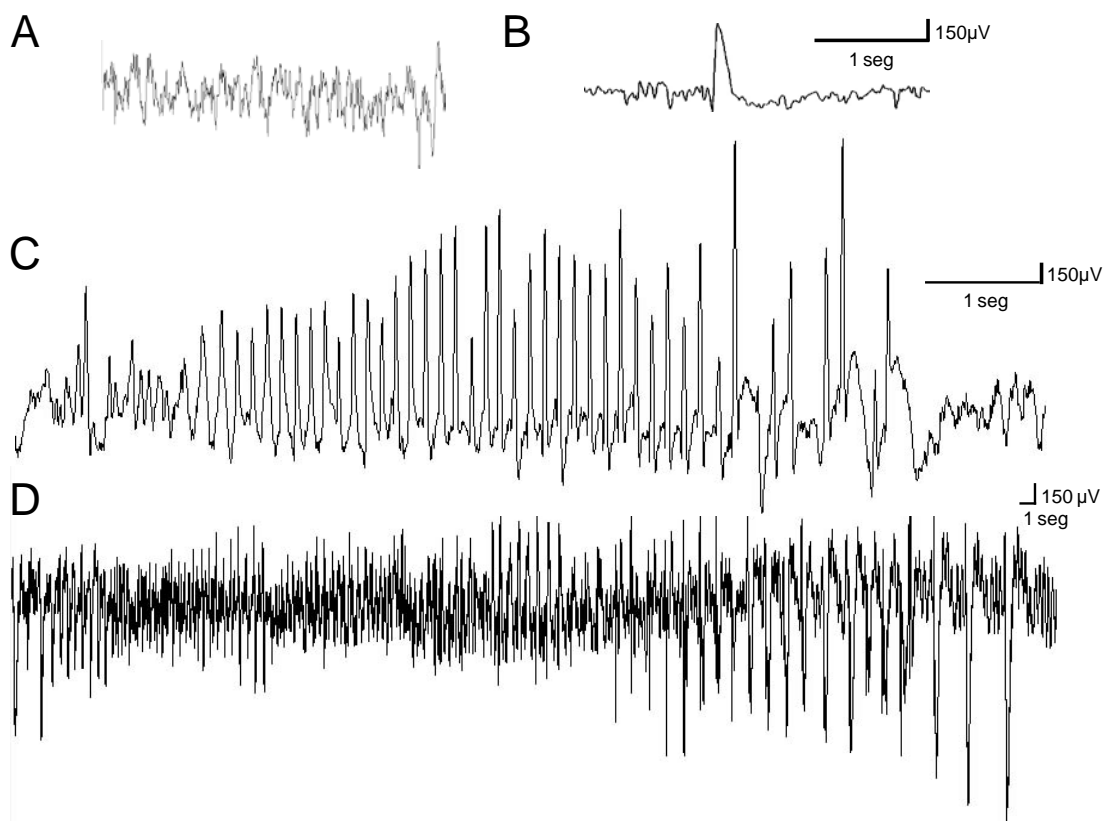
**Figura 37. Agregados de la proteína tau hiperfosforilada teñidos con el anticuerpo AT8 en cerebro de ratones  $Tau^{VLW}$  a los 18 meses de edad.** Se observan acúmulos de tau en DG (A y C), en el núcleo de la amígdala (Amyg, B), en corteza piriforme (Cx Pir, B y D), en CA1 (A y E) y en CA2 (F). Amyg: Amígdala; CA: Cuerno de Amón; Cx Pir: Corteza piriforme; DG: Giro dentado. La barra en A y B corresponde a 198  $\mu\text{m}$ , en C y F a 55  $\mu\text{m}$  y en D y E a 22  $\mu\text{m}$ .

### 2.3. Actividad electroencefalográfica cortical de los ratones $Tau^{VLW}$

En estado basal, se observó que los ratones  $Tau^{VLW}$  mostraban crisis epilépticas espontáneas. Por ello, se analizó la actividad electroencefalográfica de estos ratones realizando registros corticales basales con un equipo de vídeo-EEG computerizado. Se

implantaron dos electrodos registradores corticales delante de la línea de Bregma (Fig. 10C) y un electrodo de referencia y otro de tierra detrás de la línea de Lambda (Fig. 10D). Tres días posteriores a la implantación de los electrodos, se procedió al registro de vídeo y de la actividad electroencefalográfica en situación basal de los ratones control y de los ratones  $Tau^{VLW}$  (Fig. 38).

Las grabaciones de vídeo- EEG mostraron que los ratones  $Tau^{VLW}$  presentaban crisis generalizadas tónico-clónicas espontáneas, al menos a partir de los 5 meses de edad (primera edad analizada en este trabajo). Estas crisis se manifestaban en el registro como complejos de punta-onda con frecuencias de 3-6 Hz (Fig. 38C) y 8-10 Hz (Fig. 38D) y que podían durar desde varios segundos (6 seg en Fig. 38C) a más de medio minuto (36 seg en Fig. 38D). Las crisis se acompañaban de manifestaciones externas en la mayor parte de los casos, aunque también aparecían crisis en los registros que no se correspondían con convulsiones ni otros signos externos (Fig. 38B).



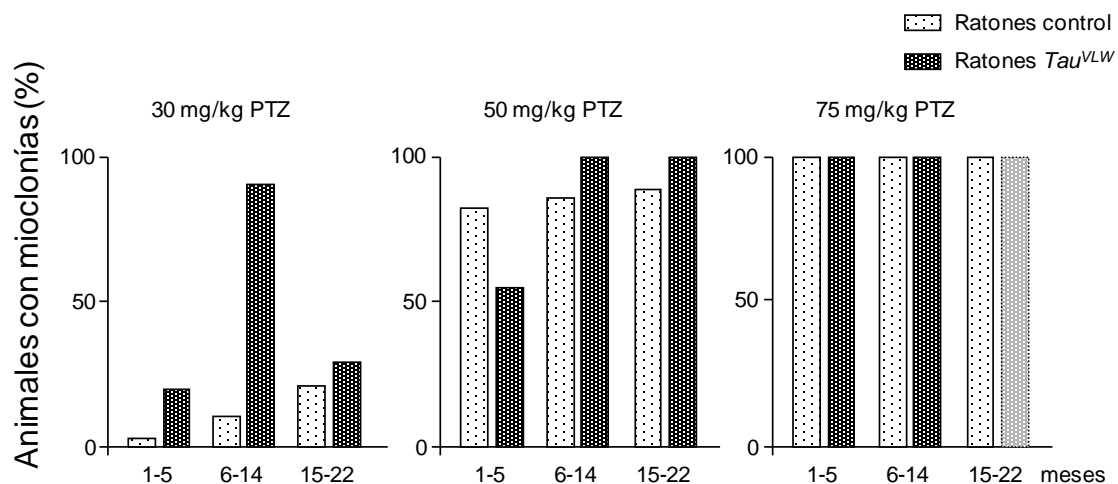
**Figura 38. Actividad electroencefalográfica cortical en ratones  $Tau^{VLW}$ .** Registros de EEG correspondientes a un ratón control con actividad basal de 6-7 Hz (A). Mioclonía espontánea sin correlato muscular externo (B). Crisis espontánea de 6 seg de duración en un ratón  $Tau^{VLW}$  de 5 meses de edad (C) y de 36 seg en un ratón de 14 meses (D). Ambas crisis se reflejaban en el registro como complejos de

punta-onda de 8-10 y de 3-6 Hz. Registros EEG obtenidos a partir de grabaciones de vídeo-EEG en el equipo Easy-EEG 2.1 (Cadwell, Lugo, España).

## 2.4. Cambios en la sensibilidad al tratamiento con PTZ en los ratones $Tau^{VLW}$

Los ratones  $Tau^{VLW}$  fueron sometidos a distintos tratamientos con el agente químico epileptógeno PTZ. Los animales se dividieron en tres grupos de edad, el grupo correspondiente a los primeros meses de vida (1-5 meses), al periodo de jóvenes-adultos (6-14 meses) y al periodo adulto-senil (15-22 meses). Estos grupos se subdividieron a su vez, en otros tres grupos a los que se les administraron 30, 50 ó 75 mg/kg de PTZ. Se analizó el porcentaje de ratones que sufrieron sacudidas musculares (Fig. 39) que manifestaron crisis epilépticas tónico-clónicas (Fig. 40) así como la letalidad producida por el tratamiento con PTZ (Fig. 41).

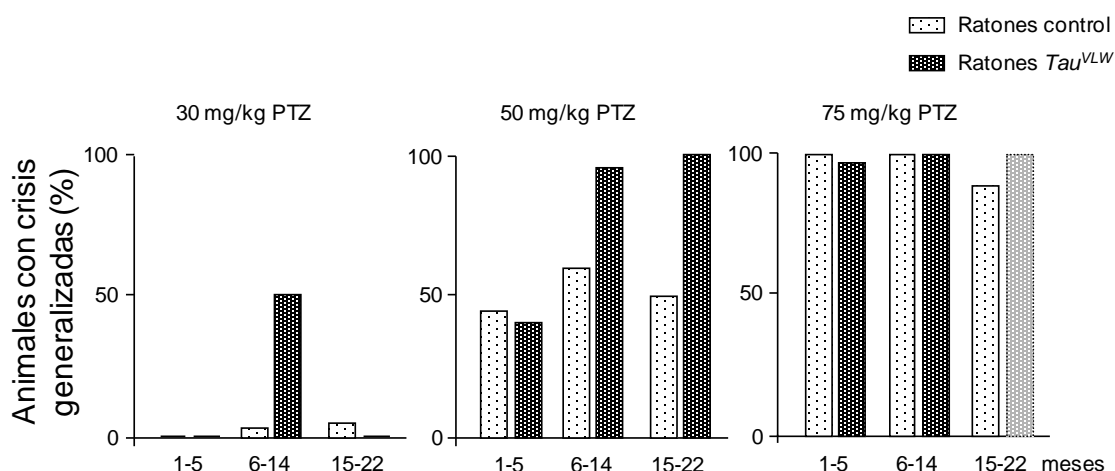
Con dosis de 30 mg/kg de PTZ, el 20% de los ratones transgénicos de tau de 1-5 presentó mioclonías, mientras que sólo un 3% de los ratones control las sufrió. Sorprendentemente, en el grupo de ratones  $Tau^{VLW}$  de 6-14 meses con esta misma dosis hasta un 90% de los ratones sufrió sacudidas musculares, mientras que a 15-22 meses de edad el porcentaje de ratones que las presentó disminuyó hasta un 29%, prácticamente igualándose con el grupo control. Tras la administración de 50 mg/kg de PTZ, el porcentaje de los ratones  $Tau^{VLW}$  que manifestó mioclonías fue notablemente menor al comparar con los ratones control en el grupo de 1-5 meses. Sin embargo, en los grupos de mayor edad, todos los ratones mutantes de tau presentaron mioclonías frente al 86% y 89% de los ratones control. Al administrar 75 mg/kg de PTZ, todos los ratones de todos los grupos de edad, y tanto los  $Tau^{VLW}$  como los animales control, presentaron mioclonías (Fig. 39). Ninguno de los ratones  $Tau^{VLW}$  de 15-22 meses fue tratado con 75 mg/kg de PTZ para evitar el sufrimiento de los animales, debido a que todos los ratones con menor dosis (50 mg/kg) manifestaron mioclonías, por lo que la gráfica marcada en gris se extrapoló. Con estos resultados observamos que los ratones  $Tau^{VLW}$  presentan una mayor sensibilidad al agente epileptógeno PTZ ya que las mioclonías aparecen a dosis menores y en mayor proporción que en los ratones control.



**Figura 39. Porcentaje de ratones  $Tau^{VLW}$  que presentaron mioclonías a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg de PTZ.** A dosis de 30 mg/kg de PTZ, el 90% de los ratones  $Tau^{VLW}$  de 6-14 meses de edad presentaron mioclonías, mientras que sólo se observaron en una pequeña proporción de los grupos control. Sin embargo, en el grupo de mayor edad el porcentaje de ratones  $Tau^{VLW}$  que presentó mioclonías con esta dosis disminuyó casi hasta el valor de los ratones control. Con 50 mg/kg de PTZ, los porcentajes de ratones  $Tau^{VLW}$  y controles que presentaron mioclonías alcanzaron el 100% en los grupos de 6-14 y de 15-22 meses de edad, no así en el grupo de animales de 1-5 meses, que sólo lo hicieron el 50%. Con dosis de 75 mg/kg de PTZ, todos los ratones, tanto transgénicos de tau como controles, presentaron mioclonías (n = 7-38). La gráfica de ratones  $Tau^{VLW}$  de 15-22 meses con dosis de 75 mg/kg, se extrapoló del valor de la dosis inferior de 50 mg/kg.

Al ser tratados con 30 mg/kg de PTZ, el 50% de los ratones  $Tau^{VLW}$  de 6-14 meses de edad presentaron crisis epilépticas, mientras que sólo lo hicieron una pequeña proporción de los ratones control, el 3%. Sin embargo, los ratones  $Tau^{VLW}$  de 1-5 meses no sufrieron crisis epilépticas, ni tampoco los ratones  $Tau^{VLW}$  de 15-22 meses de edad, al igual que sucedió con los ratones control. Con dosis de 50 mg/kg de PTZ, el 100% de los ratones  $Tau^{VLW}$  de los grupos de mayor edad presentaron crisis epilépticas frente al 55% de los ratones control, mientras que el porcentaje de ratones  $Tau^{VLW}$  que sufrió crisis epilépticas a los 1-5 meses de edad fue similar a los ratones control, aproximadamente el 43%. El porcentaje de ratones mutantes de tau que desarrolló crisis a dosis de 75 mg/kg de PTZ fue similar a la de los ratones control, llegando prácticamente a alcanzar el 100% (Fig.40). De forma similar al estudio anterior, la gráfica del grupo de mayor edad de ratones  $Tau^{VLW}$  se extrapoló ya que ninguno de estos ratones fue tratado con la dosis letal de PTZ al observarse que con una dosis inferior (50 mg/kg) el 100% de los ratones presentaron crisis epilépticas. Así, la sobre-expresión de la proteína tau humana mutada también produce una disminución en el umbral de

aparición de crisis epilépticas con PTZ, pero este efecto es diferente en el grupo de menor edad a dosis de 30 y 50 mg/kg y en el grupo de mayor edad a 30 mg/kg.

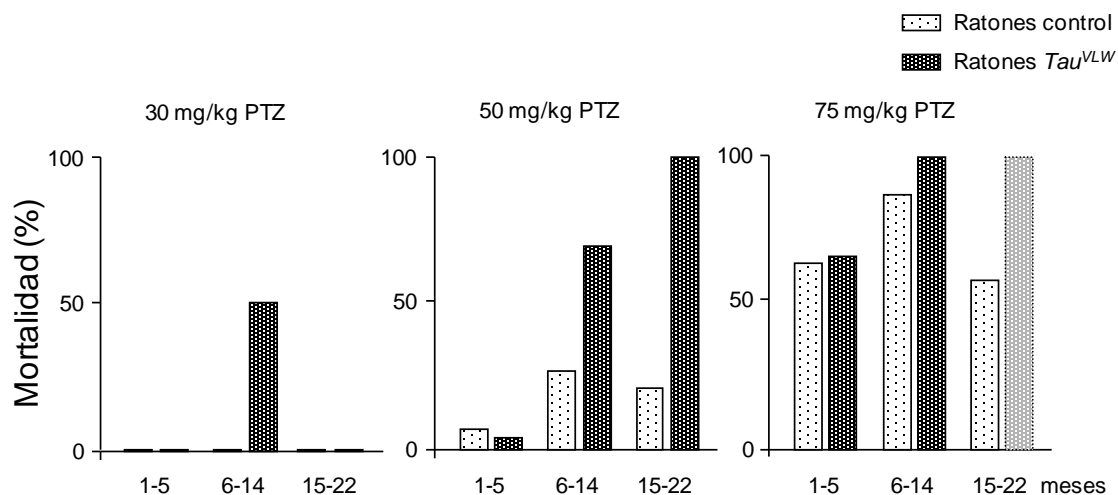


**Figura 40. Porcentaje de ratones  $Tau^{VLW}$  con crisis generalizadas a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg de PTZ.** Al administrar 30 mg/kg de PTZ, el 50% de los ratones  $Tau^{VLW}$  presentó crisis epilépticas en el grupo de 6-14 meses de edad frente a un porcentaje del 3% de los ratones control. Con 50 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones  $Tau^{VLW}$  que presentaron crisis epilépticas, se situó en torno al 100% en los grupos de 6-14 y de 15-22 meses de edad mientras que sólo alcanzó el 43% en el grupo de 1-5 meses de edad. Con dosis de 75 mg/kg de PTZ, alrededor del 100% de los ratones transgénicos de tau presentaron crisis epilépticas (n = 7-38). La gráfica de ratones  $Tau^{VLW}$  de 15-22 meses con dosis de 75 mg/kg se extrapoló del valor de la dosis inferior de 50 mg/kg.

El tratamiento de 30 mg/kg de PTZ produjo la muerte del 50% de los ratones  $Tau^{VLW}$  a los 6-14 meses de edad, mientras que con esta dosis no se observó mortalidad en el resto de ratones a las otras edades analizadas. Con dosis de 50 mg/kg de PTZ, en los grupos de 6-14 y 15-22 meses de edad, el porcentaje de ratones transgénicos de tau que murieron fue muy superior al de los ratones control de su misma edad, el 70% frente al 27% a 6-14 meses y el 100% frente al 21% a 15-22 meses. Sin embargo, la letalidad en los grupos de ratones de 1-5 meses de edad fue similar y muy baja. Cuando los ratones fueron tratados con 75 mg/kg de PTZ, el porcentaje de ratones  $Tau^{VLW}$  que murieron fue similar al de los ratones control a los 1-5 meses de edad. A los 6-14 meses de edad, el 100% de los ratones transgénicos de tau murieron frente al 87% de los ratones control. Como se mencionó previamente, a los 15-22 meses ningún ratón  $Tau^{VLW}$  fue tratado con 75 mg/kg de PTZ para evitar su sufrimiento, extrapolándose el valor 100% de la dosis inferior de 50 mg/kg. A esta edad, la letalidad producida por PTZ en el grupo de ratones  $Tau^{VLW}$ , se situó en el doble de la del grupo de ratones

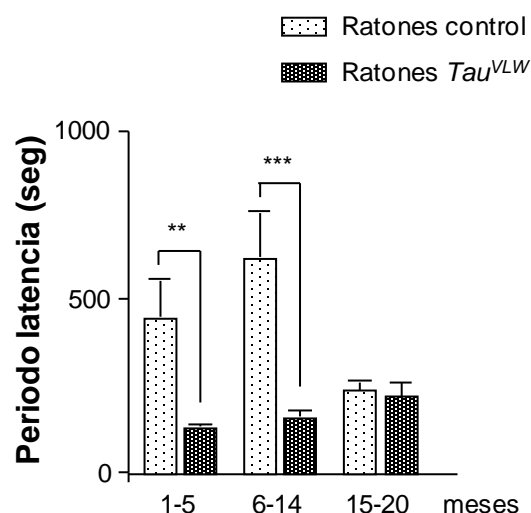


control (Fig. 41). Con estos resultados, observamos que la sobre-expresión de la proteína tau humana mutada produce un aumento de la letalidad producida por el agente epileptógeno PTZ.



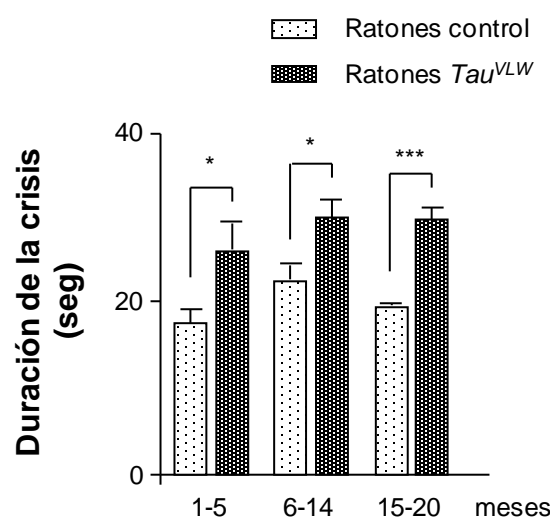
**Figura 41. Letalidad de ratones  $Tau^{VLW}$  a dosis de 30, 50 y 75 mg/kg de PTZ.** Con dosis de 30 mg/kg de PTZ, murió el 50% de los ratones transgénicos de tau de 6-14 meses de edad. Al aplicar 50 mg/kg de PTZ, murieron el 70% y el 100% de los ratones  $Tau^{VLW}$  de 6-14 y de 15-22 meses de edad, respectivamente, pero este efecto no se observó en el grupo de 1-5 meses de edad. Cuando se inyectaron dosis de 75 mg/kg de PTZ, la letalidad de los ratones  $Tau^{VLW}$  fue de 100% en los dos grupos de mayor edad ( $n = 7-38$ ). La gráfica de ratones  $Tau^{VLW}$  de 15-22 meses con dosis de 75 mg/kg se extrapoló del valor de la dosis inferior de 50 mg/kg.

Para analizar si en los ratones transgénicos de hTauVLW variaba también el periodo de latencia y la duración de las crisis producidas por el PTZ, a los ratones  $Tau^{VLW}$  y a los ratones control se les inyectó una dosis de 50 mg/kg de PTZ a las diferentes edades analizadas. El periodo de tiempo que tardaron los ratones  $Tau^{VLW}$  en presentar la crisis tónico-clónica fue significativamente menor que en los ratones control en los grupos de 1-5 y de 6-14 meses de edad, mientras que en el grupo de 15-20 meses no se observaron diferencias significativas, sólo una tendencia a que el periodo de latencia de los ratones transgénicos fuera menor que en los controles (Fig.42).



**Figura 42. Periodo de latencia desde la inyección de 50 mg/kg de PTZ hasta la aparición de crisis tónico-clónicas en ratones  $Tau^{VLW}$ .** El tiempo transcurrido desde la administración del PTZ hasta la aparición de las crisis fue significativamente menor en los grupos de ratones transgénicos de tau de 1-5 y de 6-14 meses de edad que en los grupos de ratones control de las edades. El grupo de ratones  $Tau^{VLW}$  de 15-20 meses también presentaba un periodo de latencia menor que el grupo control, pero estas diferencias no fueron significativas. Los datos se analizaron usando el test *t-Student*. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  ( $n = 5-19$ ).

Además, las crisis que sufrieron los ratones  $Tau^{VLW}$  cuando se les inyectó una dosis de 50 mg/kg de PTZ presentaban una mayor duración que las que manifestaron los ratones control en todos los grupos de edad (Fig.43).



**Figura 43. Duración de las crisis después de la inyección de 50 mg/kg de PTZ en ratones  $Tau^{VLW}$ .** Los ratones  $Tau^{VLW}$  a todas las edades analizadas presentaron una duración de las crisis significativamente

más largas que las de los ratones control. Los datos se analizaron mediante un test *t-Student*. \* $p < 0.05$ ;  
\*\*\* $p < 0.001$  (n = 5-19).

## **DISCUSIÓN**

## 1. Los modelos animales de la enfermedad de Lafora *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup>

En este trabajo se describen las alteraciones neurológicas que presentan dos modelos animales de la enfermedad de Lafora, generados mediante manipulación genética de los dos genes relacionados con esta patología, los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup>. Estos ratones presentan déficit de actividad motora, de equilibrio, de memoria y discinesias que se corresponden con la abundante presencia de cuerpos de Lafora en distintas regiones del cerebro. La ausencia de laforina y malina también produce manifestaciones epilépticas, mioclonías y crisis tónico-clónicas, con o sin correlato electroencefalográfico y un aumento de la sensibilidad al agente epileptógeno PTZ.

La enfermedad de Lafora es un tipo de epilepsia mioclónica progresiva que se presenta en la adolescencia con la aparición de diferentes síntomas epilépticos, como crisis generalizadas tónico-clónicas y ausencias, y evoluciona rápidamente hacia un empeoramiento clínico, apareciendo una demencia progresiva que lleva a los pacientes a un estado vegetativo y a la muerte, aproximadamente diez años después de la manifestación de los primeros síntomas neurológicos. La característica histopatológica más destacada de la enfermedad de Lafora es la presencia de unos cuerpos de inclusión citoplásmicos formados por poliglucosanos, una forma de glucógeno anormalmente ramificada, que se denominan cuerpos de Lafora. Desde el descubrimiento de la presencia de mutaciones en los genes que codifican las proteínas laforina y malina en pacientes con enfermedad de Lafora (Chan et al., 2003; Minassian et al., 1998; Serratosa et al., 1999) se han intentado identificar los mecanismos moleculares en los que están implicadas estas proteínas y su posible relación con la aparición de los cuerpos de Lafora. Así, se ha observado que el complejo laforina-malina produce la ubiquitinación y la degradación dependiente del proteosoma de proteínas relacionadas con la regulación de la biosíntesis de glucógeno, la GS, la PTG y la GBE (Cheng et al., 2007; Gentry et al., 2005; Solaz-Fuster et al., 2008; Vilchez et al., 2007; Worby et al., 2008) al tiempo que aumenta la eliminación de las proteínas celulares plegadas incorrectamente protegiendo de la toxicidad inducida por estrés (Garyali et al., 2009). Gracias al estudio de los modelos animales *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> se ha observado que la ausencia del complejo laforina-malina produce una alteración de los mecanismos de autofagia (Aguado et al., 2010; Criado et al., 2011). También se ha propuesto que

mediante su actividad glucógeno fosfatasa, la proteína laforina suprime la fosforilación excesiva del glucógeno y previene la formación de glucógeno hiperfosforilado, pobremente ramificado y propenso a agregarse (Fernandez-Sanchez et al., 2003; Tagliabracci et al., 2008; Tagliabracci et al., 2007; Worby et al., 2006). Además, se ha visto que la inhibición de la síntesis de glucógeno mediante la eliminación del PTG, en ausencia de la proteína laforina en un ratón doble mutante, previene la formación de cuerpos de Lafora y elimina las crisis mioclónicas (Turnbull et al., 2011).

Ya que los pacientes con enfermedad de Lafora manifiestan mioclonías, ataxia cerebelosa, demencia, así como alteraciones en el movimiento (Berkovic et al., 1986; Chan et al., 2004; Ganesh et al., 2002b; Van Heycop Ten Ham, 1974), nos planteamos un análisis más profundo de las alteraciones de comportamiento derivadas de la ausencia de la proteína laforina en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> (Ganesh et al., 2002a) y de la ausencia de la proteína malina en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> (Criado et al., 2011). La aparición de los cuerpos de Lafora en regiones específicas del cerebro de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> reproduce la característica neuropatológica más destacada de los pacientes con enfermedad de Lafora, que precede a la aparición de alteraciones neurológicas y de comportamiento. Así, los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> presentan cuerpos de Lafora similares en cuanto a forma, tamaño y composición a los descritos en humanos. Estos cuerpos de Lafora empiezan a aparecer a los dos meses de edad, muchos de ellos reaccionan con anticuerpos frente a ubiquitina (Criado et al., 2011) y su número y tamaño aumentan con la edad, detectándose alteraciones neurológicas a partir de los cuatro meses de edad. Como hemos señalado previamente, la ausencia del complejo laforina-malina en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> produce una disfunción de la autofagia como primera manifestación patológica, que también podría contribuir a la acumulación de los cuerpos de Lafora y de proteínas ubiquitinadas (Rao et al., 2010; Kondomerkos et al., 2005; Shea 2009). También a partir de los dos meses en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y de forma previa a la aparición de los cuerpos de Lafora, se observan signos de neurodegeneración sin activación de apoptosis (Ganesh et al., 2002a). En los ratones nulos para la expresión de malina, también se observó la presencia de cuerpos de Lafora de pequeño tamaño a los dos meses de edad, que reaccionaban con anticuerpos contra ubiquitina, pero no se observaron signos de neurodegeneración antes de la aparición de estos agregados (Criado et al., 2011). En los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>, los cuerpos de Lafora neuronales son positivos para ubiquitina, sin embargo, estas inclusiones en hígado y músculo no

reaccionan con ubiquitina, por lo que se ha sugerido que los cuerpos de Lafora neuronales presentan mecanismos patológicos diferentes a los de otros tejidos (Ganesh et al., 2002a)

La ausencia de expresión de la proteína laforina en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> también dio lugar a la aparición de alteraciones en el comportamiento motor y la actividad exploratoria. En el actímetro, los ratones control jóvenes muestran una tendencia a estabilizar la cantidad de movimiento en los desplazamientos de superficie cuando llevan un tiempo explorando, ya que al conocer el entorno pierden el interés por explorar. Sin embargo, los ratones jóvenes nulos para la expresión de laforina no muestran esta tendencia y continúan explorando e incrementando la cantidad de movimiento a lo largo del test. Además, también muestran mayor cantidad de movimientos estereotipados y de alzamientos. Este comportamiento podría reflejar la presencia de estados de hiperactividad, ansiedad y/o estrés en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> de corta edad (Lever et al., 2006; Ridley, 1994). Sin embargo, estas diferencias en la cantidad de movimiento en el actímetro en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> con respecto a los ratones control no fueron significativas en los grupos de mayor edad, reflejando quizás un empeoramiento del comportamiento motor con la edad. Por otra parte, también los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> presentaron alteraciones en la actividad motora y en el comportamiento exploratorio pero, en este caso, los ratones nulos para la expresión de malina, tanto jóvenes como adultos, presentaron una menor cantidad de movimientos con desplazamiento, estereotipados y alzamientos al compararlos con los ratones control. La disminución de la actividad motora en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> podría estar causada por la abundante presencia de cuerpos de Lafora en los núcleos motores del troncoencéfalo y en el cerebelo principalmente, aunque también podría reflejar un estado de falta de ansiedad con baja actividad exploratoria y/o depresión debidos a la ausencia de malina (Cryan and Holmes, 2005; Krishnan and Nestler, 2011). Hasta la descripción del modelo de ratón *Epm2b*<sup>-/-</sup> generado en el grupo de Valles-Ortega (Valles-Ortega et al., 2011) no se habían descrito alteraciones neurológicas en los otros modelos deficientes para la expresión de malina (DePaoli-Roach et al., 2010; Turnbull et al., 2010). Los datos observados en este modelo presentan algunas diferencias con respecto a los datos obtenidos con los ratones generados en nuestro grupo. Este grupo realizó un ensayo de campo abierto (*open field test*) para medir el comportamiento exploratorio de su línea de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> y observaron que a los once meses de edad presentaban hiperactividad

y mostraban un aumento del comportamiento exploratorio con respecto a los ratones control. Este comportamiento en campo abierto reflejaría un estado de ansiedad y/o estrés (Lever et al., 2006; Ridley, 1994) similar al que nosotros observamos en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, al mismo tiempo estos autores señalaron que los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> permanecían mucho tiempo en el centro de la arena (Valles-Ortega et al., 2011), actitud que indicaría una ausencia de ansiedad (Prut and Belzung, 2003). Estas discrepancias podrían explicarse en base a la existencia de distintos fondos genéticos en estas líneas de ratón debido a las cepas utilizadas y al número de retrocruces que se realizaron en las colonias. Este distinto fondo genético podría afectar a los patrones de comportamiento de forma diferencial (Schauwecker, 2011).

Los ratones deficientes para la expresión de laforina también mostraron alteraciones en la coordinación motora y el equilibrio. Estas alteraciones fueron mucho más importantes en los ratones adultos, algunos de los cuales no fueron capaces de aprender a caminar ni de mantenerse sobre el rodillo del rotarod. Previamente, se había publicado un ensayo en el rotarod con la misma línea de ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>, en el que se describía que a los cuatro meses de edad no mostraban diferencias con respecto a los ratones control pero sí se observaban alteraciones a los nueve meses de edad (Ganesh et al., 2002a). Nuestros datos confirman y amplían esos resultados. De la misma manera que los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>, los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> mostraron importantes alteraciones en la coordinación motora y el equilibrio, aunque este problema estaba menos acentuado en los ratones de mayor edad. Valles-Ortega y cols. (Valles-Ortega et al., 2011) realizaron este mismo ensayo en su modelo de ratón nulo para la expresión de malina a los once meses de edad, pero no llegaron a observar diferencias con los ratones control. De nuevo, nuestros resultados amplían esos estudios al observar alteraciones a distintas edades. Además, en los dos modelos de ratón deficientes para la expresión de laforina y malina también se observó la presencia de discinesias y posturas anormales que se agravaban notablemente en los grupos de mayor edad y significativamente más importantes en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> que en los *Epm2a*<sup>-/-</sup>. Las alteraciones motoras, de equilibrio y la presencia de discinesias y posturas anormales de los ratones deficientes para la expresión de laforina y malina, podrían ser una consecuencia de la presencia de los cuerpos de Lafora en los núcleos basales y núcleos motores del troncoencéfalo y cerebelo principalmente, así como de los procesos neurodegenerativos que aparecen en estas regiones cerebrales.



Los estudios de memoria episódica o memoria a corto plazo en estos modelos indicaron que los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> presentaban un índice de discriminación de objetos significativamente más bajo que los ratones control reflejando la existencia de un importante déficit de memoria episódica que fue aún más relevante en los ratones de mayor edad. Por otro lado, el grupo de ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> mostraron un índice de discriminación más bajo que los ratones control y notablemente más reducido que los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>. En ambos modelos, estas deficiencias de memoria episódica también se agravaban sustancialmente con la edad, probablemente empeoradas por las deficiencias en actividad exploratoria que presentaban estos ratones en los estudios de actividad motora. Así, tanto la ausencia de expresión de la proteína laforina como de malina en nuestros ratones conduce a una importante pérdida de memoria. Por lo tanto, los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> podrían constituir un buen modelo experimental para investigar los procesos moleculares implicados en el deterioro cognitivo que se observa en los pacientes con enfermedad de Lafora (Berkovic et al., 1986; Chan et al., 2004; Ganesh et al., 2002b; Van Heycop Ten Ham, 1974). El déficit de memoria que manifiestan estos ratones podría ser una consecuencia de la abundante presencia de cuerpos de Lafora y de procesos neurodegenerativos en la corteza cerebral e hipocampo. El grupo de Valles-Ortega y cols. (Valles-Ortega et al., 2011) evaluó la memoria asociativa o memoria a largo plazo de sus ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> a los once meses de edad con el test de acondicionamiento operante (*operant conditioning test*) (Madronal et al., 2010) y observaron que sus ratones deficientes para la expresión de malina no presentaron alteraciones de memoria cuando los compararon con los ratones control, a pesar de que esos ratones presentaban importantes alteraciones morfológicas y funcionales en el hipocampo, como describen en este mismo trabajo con estudios histológicos y neurofisiológicos, respectivamente. De nuevo, aunque no se deben descartar otros motivos, estas diferencias se podrían atribuir a la existencia de distintos fondos genéticos en nuestros modelos animales.

Los enfermos de Lafora presentan, además, anormalidades epileptiformes multifocales a parte de brotes generalizados, con mioclonías continuas que se corresponden con complejos de punta-onda de 3-6 Hz en el EEG (Berkovic et al., 1991; Van Heycop Ten Ham, 1974). Se analizaron las posibles alteraciones en la actividad electroencefalográfica basal de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> y se observó que ambos modelos animales manifestaban mioclonías continuas desde los tres meses de edad, que

se correspondían con sacudidas musculares en el vídeo y con puntas, complejos de punta-onda o polipuntas en el EEG. Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> mostraban además crisis epilépticas tónico-clónicas espontáneas, de 4-6 Hz y de pocos segundos a medio minuto de duración, mientras que los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> presentaban crisis epilépticas tónico-clónicas pero que carecían de correlato eléctrico en el EEG. Estudios previos en ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> (Ganesh et al., 2002a) habían mostrado la presencia de crisis mioclónicas espontáneas que duraban escasos segundos y consistían en sacudidas musculares, correspondientes a puntas o complejos de punta-onda, pero sin embargo, no encontraron crisis epilépticas tónico-clónicas en estos ratones. Tampoco se describió la presencia de mioclonías o crisis epilépticas en registros electroencefalográficos de actividad basal en los trabajos previos de los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> (Valles-Ortega et al., 2011) aunque sí se observó la presencia de potenciales evocados de larga duración en estos ratones, así como la mayor propensión a sufrir crisis hipocámpales tras el tratamiento con ácido kaínico.

Con anterioridad a la generación de los modelos experimentales generados a través de técnicas de manipulación genética caracterizados previamente, los modelos animales que se habían utilizado más frecuentemente para estudiar la epilepsia eran los modelos farmacológicos. Estos modelos, se generan mediante el tratamiento con diferentes agentes convulsionantes como son el ácido kaínico (Ben-Ari et al., 1981; Zaczek et al., 1981), la pilocarpina (Turski et al., 1983) o el PTZ (Reinhard and Reinhard, 1977; Swinyard, 1989; Verdinakis, 1969; Vernadakis and Woodbury, 1969). El PTZ induce una fase aguda de estado epiléptico caracterizado por crisis tónico-clónicas y se ha utilizado frecuentemente en animales como un modelo de epilepsia generalizada ya que se une y bloquea al receptor GABA<sub>A</sub> produciendo alteraciones en la actividad del canal de cloro y bloqueando la actividad inhibitoria mediada por GABA (Andre et al., 1998). Habitualmente, el PTZ se emplea como droga epileptógena para posteriormente evaluar la eficacia de ciertos fármacos antiepilépticos en animales de experimentación. A diferentes concentraciones en las que el PTZ puede provocar desde convulsiones leves a crisis, el PTZ induce una activación excesiva de neuronas de la amígdala, estructura cerebral implicada en epilepsia (Pereno and Beltramino, 2010; Pitkanen et al., 1998) pero no la muerte de las mismas.

En este trabajo, se analizó la sensibilidad de nuestros modelos animales *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> al agente epileptógeno PTZ y se observó que presentaban alteraciones con

respecto a los animales control. Así, el tratamiento con PTZ en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup>, reflejó que la ausencia de laforina producía un aumento en la sensibilidad a este agente epileptógeno con respecto a los ratones control, ya que presentaban convulsiones y crisis epilépticas a dosis más bajas. Además, las crisis en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> aparecían en un periodo de tiempo más corto después del tratamiento con PTZ que en los ratones control y tendían a presentar una mayor duración. Los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> también mostraron un umbral de aparición de sacudidas musculares más bajo en respuesta al tratamiento con PTZ y una mayor duración de las crisis, aunque en el resto de las variables analizadas la ausencia de malina parecía proteger a los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup> de la toxicidad a este agente. Estos resultados reflejan la existencia de alguna alteración del sistema GABAérgico, más importante en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> que en los ratones *Epm2b*<sup>-/-</sup>, que se agravaría con la administración de PTZ. La alteración de la transmisión GABAérgica podría también explicar los estados de hiperactividad de los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> que se reflejaban en una mayor actividad motora.

La ausencia del complejo laforina-malina en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> produce una disfunción de la autofagia como primera manifestación patológica, que podría llevar a la acumulación de poliglucosanos y de proteínas ubiquitiniladas e iniciar la formación de los cuerpos de Lafora (Aguado et al., 2010; Criado et al., 2011), un proceso que se agravaría por la desaparición de la actividad glucógeno fosfatasa de la laforina (Gentry et al., 2007; Tagliabracci et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento no se conocen las causas de la aparición de epilepsia en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup>, ni la relación que existe entre la formación de los cuerpos de Lafora y las alteraciones en la actividad electroencefalográfica.

Los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> muestran muchos de los rasgos patológicos presentes en los pacientes con la enfermedad de Lafora. Los resultados obtenidos en este trabajo ayudarán a diseñar sistemas experimentales para el ensayo de sustancias químicas que puedan alterar los síntomas de la enfermedad. De esta manera, esperamos encontrar una vía para el desarrollo de nuevas terapias que ayuden a aliviar las manifestaciones clínicas de la enfermedad e incluso, prevenir la aparición de las mismas.

## 2. El modelo animal de la FTDP-17, los ratones *Tau*<sup>VLW</sup>

Existen numerosas enfermedades neurodegenerativas que presentan mioclonías y crisis epilépticas espontáneas, entre ellas, ciertos casos de demencias y tauopatías. En los enfermos con demencias y tauopatías no son frecuentes las crisis epilépticas pero, sin embargo, sí son más frecuentes que en la población general. Así, se han descrito ciertos casos de pacientes con DCB, PSP y FTDP-17 con síntomas clínicos de epilepsia (Douglas et al., 2009) (Filla et al., 2002; Klimek et al., 1998; Kofler et al., 2000; Nygaard et al., 1989) (Filla et al., 2002; Hesdorffer et al., 1996; Sperfeld et al., 1999). Sin embargo, es en el caso de la enfermedad de Alzheimer donde se ha observado que existe un mayor riesgo de padecer epilepsia que en la población general (Amatniek et al., 2006; Hauser et al., 1986; Mendez et al., 1994; Risse et al., 1990; Romanelli et al., 1990; Scarmeas et al., 2009) y que las personas que sufren formas hereditarias de la enfermedad, normalmente asociadas a una aparición precoz de la misma, tienen una probabilidad mayor de sufrir un ataque epiléptico que las personas con diagnóstico tardío (Hauser et al., 1986; Snider et al., 2005).

Existen numerosas causas posibles para la aparición de crisis epilépticas en la enfermedad de Alzheimer como son el aumento de la producción de  $\beta$ -amiloide, el aumento de estrés oxidativo y la alteración de la homeostasis de calcio (Chow et al., 2010; Gleichmann and Mattson, 2010; Noebels, 2011; Rothman and Mattson, 2010). También en los pacientes con esta enfermedad se producen alteraciones del citoesqueleto que provocan cambios en la estructura neuronal, como el crecimiento neurítico y la formación de conexiones aberrantes, el *sprouting* GABAérgico con el aumento de inhibición sináptica, las deficiencias en plasticidad sináptica, alteraciones cerebrovasculares y disfunciones de neurotransmisores y/o canales iónicos (Chow et al., 2010; Gleichmann and Mattson, 2010; Noebels, 2011; Palop and Mucke, 2010b; Rothman and Mattson, 2010) que podrían ser responsables del desarrollo de desequilibrios en conexiones excitatorias e inhibitorias y, finalmente, de la aparición de epilepsia.

Recientemente, se ha descrito la presencia de crisis espontáneas no convulsivas en circuitos corticales e hipocampales y de descargas interictales en modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer que tenían incrementada la producción del péptido -

amiloide, (Minkeviciene et al., 2009; Palop et al., 2007; Palop and Mucke, 2009; Palop and Mucke, 2010a; Vogt et al., 2009; Westmark et al., 2008). En estos ratones, también se observó que el aumento de  $\beta$ APP/ -amiloide produce una actividad excitatoria aberrante que dispara mecanismos inhibitorios compensatorios, *sprouting* GABAérgico e inhibición sináptica en circuitos de hipocampo. La actividad excitatoria aberrante y los mecanismos inhibitorios compensatorios limitan la plasticidad sináptica produciendo déficit de aprendizaje y memoria. Además, las manipulaciones experimentales que previenen la aparición de crisis en estos modelos de APP $\beta$  -amiloide también previenen los déficits cognitivos, indicando que los factores responsables de ambos fenómenos son comunes (Roberson et al., 2007). Por otro lado, también se observó que los altos niveles de  $\beta$ -amiloide en los modelos de APP/ $\beta$ -amiloide son suficientes para provocar actividad epileptiforme y crisis, en ausencia de procesos neurodegenerativos y de muerte neuronal (Palop et al., 2007), pero que este efecto no se producía en ausencia de la proteína tau normal (Roberson et al., 2007).

El estudio de los modelos animales de la enfermedad de Alzheimer que se han generado hasta el momento, ha llevado al descubrimiento de múltiples modificaciones en numerosos mecanismos neuronales, que podrían conducir a desarrollar una hiperexcitabilidad neuronal en circuitos específicos cerebrales y a la aparición de actividad y crisis epilépticas (Palop et al., 2006; Palop et al., 2007). Así, se han descrito alteraciones en genes de expresión temprana inmediata, incluyendo Fos y proteínas de citoesqueleto, en moléculas de adhesión e integrinas, en receptores NMDA, AMPA y metabotrópicos de glutamato y nicotínicos de acetilcolina, en vesículas sinápticas y exocitosis, en rutas de fosforilación/defosforilación (MAP kinasas, cdk5, tirosin-kinasas/fosfatasas) en las espinas dendríticas, así como en la transmisión sináptica basal y en la plasticidad neuronal (Mark et al., 1995; Palop et al., 2007; Palop and Mucke, 2009; Peng and Houser, 2005; Rothman and Olney, 1995; Snyder et al., 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios electroencefalográficos realizados en ratones transgénicos de APP $\beta$ / -amiloide revelaron la presencia de descargas epileptiformes corticales e hipocámpales y crisis generalizadas no convulsivas (Minkeviciene et al., 2009; Palop et al., 2007; Vogt et al., 2009; Westmark et al., 2008) si estaba presente la proteína tau normal. Sin embargo, hasta el momento no se habían descrito crisis epilépticas espontáneas en ratones con modificaciones en la proteína tau. En este trabajo se ha analizado la actividad electroencefalográfica de una

línea de ratones transgénicos de tau con tres mutaciones de FTDP-17, los ratones *Tau<sup>VLW</sup>* (Lim et al., 2001) y se ha observado la presencia de crisis epilépticas tónico-clónicas espontáneas caracterizadas por complejos de punta-onda de baja y media frecuencia y desde varios segundos a más de medio minuto de duración. Además, cuando se les administró el agente epileptógeno PTZ se observó que estos ratones eran más propensos a sufrir mioclonías y crisis epilépticas tónico-clónicas que los ratones control, así como que presentaban una mayor letalidad. El tratamiento con PTZ en los ratones transgénicos de tau reflejó que la sobre-expresión de la proteína tau humana mutada producía un aumento en la sensibilidad de los ratones a este agente, ya que presentaban un mayor porcentaje de convulsiones y crisis epilépticas a dosis subconvulsivas y un mayor porcentaje de mortalidad. En concreto, a los 6-14 meses de edad, la dosis subconvulsiva mínima utilizada en estos tratamientos (30 mg/kg) producía mioclonías a casi la totalidad de los animales analizados y crisis epilépticas tónico-clónicas y mortalidad a la mitad de ellos. Además, la dosis de PTZ que produce crisis al 50% de los ratones control (50 mg/kg) producía mioclonías y crisis epilépticas a casi el 100% de los ratones *Tau<sup>VLW</sup>* a partir de los 6-14 meses de edad y la muerte al 100% de los mayores. Este efecto no se producía en los ratones de menor edad con las dosis utilizadas, ni en el grupo de mayor edad a la dosis de PTZ más baja. Sin embargo, en todos los casos después del tratamiento con PTZ, las crisis aparecían antes que las de los ratones control y presentaban una mayor duración. El destacado aumento de la sensibilidad al PTZ en estos ratones refleja la presencia de modificaciones del sistema GABAérgico, que podrían estar producidas por la aparición de los agregados de la proteína tau hiperfosforilada. Estos agregados podrían alterar la conectividad inhibitoria GABAérgica y así originar hiperexcitabilidad y epilepsia en estados basales. Sin embargo, estos efectos no se producían en los ratones más jóvenes, probablemente debido a que todavía no presentan agregados de la proteína tau hiperfosforilada ni otras neuropatologías importantes.

En personas de edad avanzada y enfermos de Alzheimer se ha visto que algunos sistemas de neurotransmisión, como el colinérgico y el glutamatérgico, están considerablemente alterados, no así el sistema GABAérgico, que presenta una menor vulnerabilidad (Rissman et al., 2007). Los procesos neurodegenerativos producen en este sistema GABAérgico ciertas modificaciones en las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, lo cual parece inducir aumentos compensatorios en las subunidades de este

receptor dentro de las células circundantes. Aunque las modificaciones en las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> debidas al envejecimiento y a enfermedades neurodegenerativas pueden ser pequeñas, los mecanismos que compensan estos cambios podrían alterar la farmacocinética y las propiedades fisiológicas del receptor (Rissman et al., 2007). La presencia de agregados anómalos de la proteína tau hiperfosforilada en cerebro de los ratones *Tau<sup>VLW</sup>*, así como las alteraciones neuronales adicionales que se producen a consecuencia de la sobre-expresión del transgen de la proteína tau humana mutada, podrían disminuir la resistencia del sistema GABAérgico y aumentar las modificaciones en la composición de sus receptores, alterando las conexiones sinápticas inhibitorias y produciendo hiperexcitabilidad y epilepsia.

En este trabajo se ha observado por primera vez la presencia de crisis epilépticas espontáneas en un modelo de ratón con patología de la proteína tau, que no presenta agregados del péptido  $\beta$ -amiloide. Este modelo, a edades avanzadas, presenta agregados de la proteína tau hiperfosforilada en ciertas regiones del cerebro principalmente relacionadas con la memoria y el aprendizaje. Por todo ello, los ratones *Tau<sup>VLW</sup>* constituyen un valioso instrumento para el estudio de los procesos moleculares responsables de la aparición de actividad epiléptica en los pacientes con demencias y tauopatías y puede ayudar a buscar una terapia eficiente para tratar estas patologías.

## **CONCLUSIONES**



- 1- La ausencia de las proteínas laforina y malina en los ratones *Epm2a*<sup>-/-</sup> y *Epm2b*<sup>-/-</sup> provoca importantes alteraciones en la actividad y coordinación motoras, así como un reflejo motor dañado y signos de discinesia. Estos déficits motores podrían ser debidos a la presencia de abundantes cuerpos de Lafora y procesos neurodegenerativos en núcleos motores del troncoencéfalo, núcleos basales y cerebelo.
- 2- La falta de expresión de las proteínas laforina y malina produce un importante deterioro cognitivo en estos ratones desde los primeros meses de vida, más notable en ausencia de malina que de laforina. Este déficit de memoria se agrava sustancialmente con la edad y se podría correlacionar con la abundante y creciente acumulación de cuerpos de Lafora en hipocampo y en corteza cerebral.
- 3- Estos modelos animales de la enfermedad de Lafora presentan además mioclonías que se reflejan en el EEG como puntas, complejos de punta-onda y polipuntas, y crisis tónico-clónicas espontáneas, con o sin correlatos electroencefalográficos. Muestran, además, una mayor sensibilidad al agente epileptógeno PTZ, antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>, que refleja la existencia de alteraciones en el sistema GABAérgico, más acentuadas en los ratones deficientes en laforina que en los deficientes en malina.
- 4- En estado basal, los ratones *Tau*<sup>VLW</sup>, modelos de la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17, muestran crisis generalizadas tónico-clónicas espontáneas. Estas crisis se corresponden en el registro con complejos de punta-onda que se acompañan de manifestaciones externas en la mayor parte de los casos, aunque también aparecen crisis en los registros que no se corresponden con convulsiones ni otros signos externos. Estas alteraciones pueden ser debidas a la presencia de agregados de la proteína tau y de procesos neurodegenerativos en ciertas regiones del cerebro de estos ratones.
- 5- La sobre-expresión de la proteína tau humana con mutaciones de FTDP-17 produce además un descenso del umbral de crisis inducidas por PTZ y una mayor sensibilidad al mismo a las diferentes dosis empleadas. Estas alteraciones indican la existencia de defectos en los circuitos GABAérgicos que podrían llevar a estadios de hiperexcitabilidad y que podrían ser responsables de la aparición de actividad electroencefalográfica y epilepsia.

6- Los modelos animales de la enfermedad de Lafora así como el modelo transgénico de la demencia frontotemporal que se han caracterizado en este trabajo reproducen muchas de las características patológicas de estas enfermedades humanas. Por lo tanto, estos modelos constituyen excelentes herramientas para el ensayo de nuevas terapias que permitan mejorar y/o aliviar los síntomas de estas enfermedades, o incluso, evitar el desarrollo de las mismas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Acharya JN, Satishchandra P, Asha T, Shankar SK. Lafora's disease in south India: a clinical, electrophysiologic, and pathologic study. *Epilepsia* 1993; 34: 476-87.
- Acharya JN, Satishchandra P, Shankar SK. Familial progressive myoclonus epilepsy: clinical and electrophysiologic observations. *Epilepsia* 1995; 36: 429-34.
- Adams R, Victor M. *Principles of Neurology*: Mc Graw-Hill, Inc. , 1993.
- Aguado C, Sarkar S, Korolchuk VI, Criado O, Vernia S, Boya P, et al. Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 2867-76.
- Amatniek JC, Hauser WA, DelCastillo-Castaneda C, Jacobs DM, Marder K, Bell K, et al. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia* 2006; 47: 867-72.
- Andre V, Pineau N, Motte JE, Marescaux C, Nehlig A. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 2094-106.
- Arendt T, Bigl V, Arendt A, Tennstedt A. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol* 1983; 61: 101-8.
- Arrasate M, Perez M, Armas-Portela R, Avila J. Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations. *FEBS Lett* 1999; 446: 199-202.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 2004; 84: 361-84.
- Ben-Ari Y, Riche D, Tremblay E, Charton G. Alterations in local glucose consumption following systemic administration of kainic acid, bicuculline or metrazol. *Eur Neurol* 1981a; 20: 173-5.
- Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1981b; 6: 1361-91.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010; 51: 676-85.
- Berkovic SF, Andermann F, Carpenter S, Wolfe LS. Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *N Engl J Med* 1986; 315: 296-305.
- Berkovic SF, Cochiu J, Andermann E, Andermann F. Progressive myoclonus epilepsies: clinical and genetic aspects. *Epilepsia* 1993; 34 Suppl 3: S19-30.
- Berkovic SF, So NK, Andermann F. Progressive myoclonus epilepsies: clinical and neurophysiological diagnosis. *J Clin Neurophysiol* 1991; 8: 261-74.
- Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 2006; 1: 1306-11.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 1993; 10: 1089-99.
- Brion JP, Couck AM, Robertson J, Loviny TL, Anderton BH. Neurofilament monoclonal antibodies RT97 and 8D8 recognize different modified epitopes in

- paired helical filament-tau in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1993; 60: 1372-82.
- Bugiani O, Murrell JR, Giaccone G, Hasegawa M, Ghigo G, Tabaton M, et al. Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 667-77.
- Busard BL, Renier WO, Gabreels FJ, Jaspas HH, van Haelst UJ, Slooff JL. Lafora's disease. Comparison of inclusion bodies in skin and in brain. *Arch Neurol* 1986; 43: 296-9.
- Buzsaki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 2002; 33: 325-40.
- Campbell AM, Holmes O. Bicuculline epileptogenesis in the rat. *Brain Res* 1984; 323: 239-46.
- Carpenter S, Karpati G. Sweat gland duct cells in Lafora disease: diagnosis by skin biopsy. *Neurology* 1981; 31: 1564-8.
- Carpenter S, Karpati G, Andermann F, Jacob JC, Andermann E. Lafora's disease: peroxisomal storage in skeletal muscle. *Neurology* 1974; 24: 531-8.
- Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, et al. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 1999; 19: 3248-57.
- Cavanagh JB. Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29: 265-95.
- Coimbra NC, Castro-Souza C, Segato EN, Nora JE, Herrero CF, Tedeschi-Filho W, et al. Post-ictal analgesia: involvement of opioid, serotonergic and cholinergic mechanisms. *Brain Res* 2001a; 888: 314-320.
- Coimbra NC, Freitas RL, Savoldi M, Castro-Souza C, Segato EN, Kishi R, et al. Opioid neurotransmission in the post-ictal analgesia: involvement of mu(1)-opioid receptor. *Brain Res* 2001b; 903: 216-21.
- Colasanti BK, Craig CR. Reduction of seizure frequency by clonazepam during cobalt experimental epilepsy. *Brain Res Bull* 1992; 28: 329-31.
- Criado O, Aguado C, Gayarre J, Duran-Trio L, Garcia-Cabrero AM, Vernia S, et al. Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy. *Hum Mol Genet* 2011; Epub ahead of print.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 775-90.
- Chan EM, Ackerley CA, Lohi H, Ianzano L, Cortez MA, Shannon P, et al. Laforin preferentially binds the neurotoxic starch-like polyglucosans, which form in its absence in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet* 2004a; 13: 1117-29.
- Chan EM, Bulman DE, Paterson AD, Turnbull J, Andermann E, Andermann F, et al. Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22. *J Med Genet* 2003a; 40: 671-5.
- Chan EM, Omer S, Ahmed M, Bridges LR, Bennett C, Scherer SW, et al. Progressive myoclonus epilepsy with polyglucosans (Lafora disease): evidence for a third locus. *Neurology* 2004b; 63: 565-7.
- Chan EM, Young EJ, Ianzano L, Munteanu I, Zhao X, Christopoulos CC, et al. Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 2003b; 35: 125-7.
- Cheng A, Zhang M, Gentry MS, Worby CA, Dixon JE, Saltiel AR. A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease. *Genes Dev* 2007; 21: 2399-409.

- Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med* 2010; 12: 1-12.
- Damasio AR. Time-locked multiregional retroactivation: a systems-level proposal for the neural substrates of recall and recognition. *Cognition* 1989; 33: 25-62.
- Delgado-Escueta AV, Ganesh S, Yamakawa K. Advances in the genetics of progressive myoclonus epilepsy. *Am J Med Genet* 2001; 106: 129-38.
- DePaoli-Roach AA, Tagliabracci VS, Segvich DM, Meyer CM, Irimia JM, Roach PJ. Genetic depletion of the malin E3 ubiquitin ligase in mice leads to lafora bodies and the accumulation of insoluble laforin. *J Biol Chem* 2010; 285: 25372-81.
- Doherty CP, Cole AJ. The requirement for ictal EEG recordings prior to temporal lobe epilepsy surgery. *Arch Neurol* 2001; 58: 678-80.
- Douglas VC, DeArmond SJ, Aminoff MJ, Miller BL, Rabinovici GD. Seizures in corticobasal degeneration: a case report. *Neurocase* 2009; 15: 352-6.
- Dubey D, Ganesh S. Modulation of functional properties of laforin phosphatase by alternative splicing reveals a novel mechanism for the EPM2A gene in Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3010-20.
- Dubey D, Parihar R, Ganesh S. Identification and characterization of novel splice variants of the human EPM2A gene mutated in Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Genomics* 2011.
- Eloqayli H, Dahl CB, Gotestam KG, Unsgard G, Hadidi H, Sonnewald U. Pentylentetrazole decreases metabolic glutamate turnover in rat brain. *J Neurochem* 2003; 85: 1200-7.
- Engel T, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernandez F. Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 $\beta$  in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 1258-68.
- Erakovic V, Zupan G, Varljen J, Laginja J, Simoncic A. Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylentetrazol kindling and pentylentetrazol--induced seizures. *Epilepsy Res* 2001; 43: 165-73.
- Feany MB, Dickson DW. Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review. *Ann Neurol* 1996; 40: 139-48.
- Fernagut PO, Diguett E, Stefanova N, Biran M, Wenning GK, Canioni P, et al. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience* 2002; 114: 1005-17.
- Fernandez-Sanchez ME, Criado-Garcia O, Heath KE, Garcia-Fojeda B, Medrano-Fernandez I, Gomez-Garre P, et al. Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 3161-71.
- Filla A, De Michele G, Coccozza S, Patrignani A, Volpe G, Castaldo I, et al. Early onset autosomal dominant dementia with ataxia, extrapyramidal features, and epilepsy. *Neurology* 2002; 58: 922-8.
- Fisch BJ. Fisch & Spehlmann's EEG primer: Basic principles of digital and analog EEG. Amsterdam: Elsevier, 1999.
- Fisher RS. Animal models of the epilepsies. *Brain Res Brain Res Rev* 1989; 14: 245-78.
- Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Ann Neurol* 1997; 41: 706-15.
- Freemont PS. RING for destruction? *Curr Biol* 2000; 10: R84-7.

- Ganesh S, Agarwala KL, Amano K, Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Yamakawa K. Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 1046-53.
- Ganesh S, Agarwala KL, Ueda K, Akagi T, Shoda K, Usui T, et al. Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2251-61.
- Ganesh S, Amano K, Delgado-Escueta AV, Yamakawa K. Isolation and characterization of mouse homologue for the human epilepsy gene, EPM2A. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 24-8.
- Ganesh S, Delgado-Escueta AV, Sakamoto T, Avila MR, Machado-Salas J, Hoshii Y, et al. Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Hum Mol Genet* 2002a; 11: 1251-62.
- Ganesh S, Delgado-Escueta AV, Suzuki T, Francheschetti S, Riggio C, Avanzini G, et al. Genotype-phenotype correlations for EPM2A mutations in Lafora's progressive myoclonus epilepsy: exon 1 mutations associate with an early-onset cognitive deficit subphenotype. *Hum Mol Genet* 2002b; 11: 1263-71.
- Ganesh S, Puri R, Singh S, Mittal S, Dubey D. Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *J Hum Genet* 2006; 51: 1-8.
- Ganesh S, Suzuki T, Yamakawa K. Alternative splicing modulates subcellular localization of laforin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002c; 291: 1134-7.
- Ganesh S, Tsurutani N, Suzuki T, Ueda K, Agarwala KL, Osada H, et al. The Lafora disease gene product laforin interacts with HIRIP5, a phylogenetically conserved protein containing a NifU-like domain. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2359-68.
- Garcia-Arencibia M, Hochfeld WE, Toh PP, Rubinsztein DC. Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21: 691-8.
- Garyali P, Siwach P, Singh PK, Puri R, Mittal S, Sengupta S, et al. The malin-laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 688-700.
- Gasa R, Jensen PB, Berman HK, Brady MJ, DePaoli-Roach AA, Newgard CB. Distinctive regulatory and metabolic properties of glycogen-targeting subunits of protein phosphatase-1 (PTG, GL, GM/RGI) expressed in hepatocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 26396-403.
- Gentry MS, Downen RH, 3rd, Worby CA, Mattoo S, Ecker JR, Dixon JE. The phosphatase laforin crosses evolutionary boundaries and links carbohydrate metabolism to neuronal disease. *J Cell Biol* 2007; 178: 477-88.
- Gentry MS, Worby CA, Dixon JE. Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 8501-6.
- Gleichmann M, Mattson MP. Alzheimer's disease and neuronal network activity. *Neuromolecular Med* 2010; 12: 44-7.
- Goedert M. Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15: 45-9.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lubke U, Vandermeeren M, et al. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5066-70.

- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 1992; 8: 159-68.
- Gomez-Abad C, Gomez-Garre P, Gutierrez-Delicado E, Saygi S, Michelucci R, Tassinari CA, et al. Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology* 2005; 64: 982-6.
- Gomez-Garre P, Sanz Y, Rodriguez De Cordoba SR, Serratosa JM. Mutational spectrum of the EPM2A gene in progressive myoclonus epilepsy of Lafora: high degree of allelic heterogeneity and prevalence of deletions. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 946-54.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1996; 16: 4491-500.
- Groups TLaM. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 416-8.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 1986a; 261: 6084-9.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986b; 83: 4913-7.
- Guerrero R, Navarro P, Gallego E, Avila J, de Yebenes JG, Sanchez MP. Park2-null/tau transgenic mice reveal a functional relationship between parkin and tau. *J Alzheimers Dis* 2008; 13: 161-72.
- Guerrero R, Navarro P, Gallego E, Garcia-Cabrero AM, Avila J, Sanchez MP. Hyperphosphorylated tau aggregates in the cortex and hippocampus of transgenic mice with mutant human FTDP-17 Tau and lacking the PARK2 gene. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 159-68.
- Harriman DG, Millar JH, Stevenson AC. Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: its clinical features and pathological basis. *Brain* 1955; 78: 325-49.
- Hauser WA, Morris ML, Heston LL, Anderson VE. Seizures and myoclonus in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1986; 36: 1226-30.
- Hesdorffer DC, Hauser WA, Annegers JF, Kokmen E, Rocca WA. Dementia and adult-onset unprovoked seizures. *Neurology* 1996; 46: 727-30.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393: 702-5.
- Ianzano L, Young EJ, Zhao XC, Chan EM, Rodriguez MT, Torrado MV, et al. Loss of function of the cytoplasmic isoform of the protein laforin (EPM2A) causes Lafora progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mutat* 2004; 23: 170-6.
- Ianzano L, Zhang J, Chan EM, Zhao XC, Lohi H, Scherer SW, et al. Lafora progressive Myoclonus Epilepsy mutation database-EPM2A and NHLRC1 (EPM2B) genes. *Hum Mutat* 2005; 26: 397.
- Ianzano L, Zhao XC, Minassian BA, Scherer SW. Identification of a novel protein interacting with laforin, the EPM2a progressive myoclonus epilepsy gene product. *Genomics* 2003; 81: 579-87.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 53-69.



- Kamei C, Sunami A, Tasaka K. Epileptogenic activity of cephalosporins in rats and their structure-activity relationship. *Epilepsia* 1983; 24: 431-9.
- Keskil IS, Keskil ZA, Canseven AG, Seyhan N. No effect of 50 Hz magnetic field observed in a pilot study on pentylenetetrazol-induced seizures and mortality in mice. *Epilepsy Res* 2001; 44: 27-32.
- Klimek A, Wojciechowska J, Niewinowska-Rupf K, Kobielski A. [A trial of progressive supranuclear palsy with carbamazepine]. *Neurol Neurochir Pol* 1998; 32: 959-67.
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Dunn WA, Jr., Levine B, van der Klei I, Seglen PO. How shall I eat thee? Autophagy 2007; 3: 413-6.
- Knecht E, Aguado C, Carcel J, Esteban I, Esteve JM, Ghislat G, et al. Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2427-43.
- Kofler M, Muller J, Reggiani L, Wenning GK. Somatosensory evoked potentials in progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 2000; 179: 85-91.
- Kotoulas OB, Kalamidas SA, Kondomerkos DJ. Glycogen autophagy in glucose homeostasis. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 631-8.
- Krishnan V, Nestler EJ. Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci* 2011; 7: 121-47.
- Lafora GR. Über das Vorkommen amyloider Körperchen im Innern der Ganglienzellen; zugleich Ein zum Studium der amyloiden Substanz im Nervensystem. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 1911; 205: 294-303.
- Lafora GR, Glueck B. Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 1911; 6: 1-14.
- Lerin C, Montell E, Nolasco T, Clark C, Brady MJ, Newgard CB, et al. Regulation and function of the muscle glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 (GM) in human muscle cells depends on the COOH-terminal region and glycogen content. *Diabetes* 2003; 52: 2221-6.
- Lever C, Burton S, O'Keefe J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci* 2006; 17: 111-33.
- Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J. FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* 2001; 18: 702-14.
- Lohi H, Ianzano L, Zhao XC, Chan EM, Turnbull J, Scherer SW, et al. Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Genet* 2005a; 14: 2727-36.
- Lohi H, Young EJ, Fitzmaurice SN, Rusbridge C, Chan EM, Vervoort M, et al. Expanded repeat in canine epilepsy. *Science* 2005b; 307: 81.
- Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 2001; 32: 367-81.
- Mackenzie L, Medvedev A, Hiscock JJ, Pope KJ, Willoughby JO. PicROTOXIN-induced generalised convulsive seizure in rat: changes in regional distribution and frequency of the power of electroencephalogram rhythms. *Clin Neurophysiol* 2002; 113: 586-96.
- Madronal N, Lopez-Aracil C, Rangel A, del Rio JA, Delgado-Garcia JM, Gruart A. Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS One* 2010; 5: e11130.
- Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 425-7.

- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo J* 1985; 4: 2757-63.
- Mark RJ, Ashford JW, Goodman Y, Mattson MP. Anticonvulsants attenuate amyloid beta-peptide neurotoxicity, Ca<sup>2+</sup> deregulation, and cytoskeletal pathology. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 187-98.
- Mendez MF, Catanzaro P, Doss RC, R AR, Frey WH, 2nd. Seizures in Alzheimer's disease: clinicopathologic study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1994; 7: 230-3.
- Minassian BA. Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. *Pediatr Neurol* 2001; 25: 21-9.
- Minassian BA, Ianzano L, Meloche M, Andermann E, Rouleau GA, Delgado-Escueta AV, et al. Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Neurology* 2000; 55: 341-6.
- Minassian BA, Lee JR, Herbrick JA, Huizenga J, Soder S, Mungall AJ, et al. Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet* 1998; 20: 171-4.
- Minassian BA, Sainz J, Serratosa JM, Gee M, Sakamoto LM, Bohlega S, et al. Genetic locus heterogeneity in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Ann Neurol* 1999; 45: 262-5.
- Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fulop L, et al. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci* 2009; 29: 3453-62.
- Nanduri AS, Kaushal N, Clusmann H, Binder DK. The maestro don Gonzalo Rodriguez-Lafora. *Epilepsia* 2008; 49: 943-7.
- Navarro P, Guerrero R, Gallego E, Avila J, Luquin R, Garcia Ruiz PJ, et al. Motor alterations are reduced in mice lacking the PARK2 gene in the presence of a human FTDP-17 mutant form of four-repeat tau. *J Neurol Sci* 2008a; 275: 139-44.
- Navarro P, Guerrero R, Gallego E, Avila J, Luquin R, Ruiz PJ, et al. Memory and exploratory impairment in mice that lack the Park-2 gene and that over-express the human FTDP-17 mutant Tau. *Behav Brain Res* 2008b; 189: 350-6.
- Noebels J. A perfect storm: Converging paths of epilepsy and Alzheimer's dementia intersect in the hippocampal formation. *Epilepsia* 2011; 52 Suppl 1: 39-46.
- Nygaard TG, Duvoisin RC, Manocha M, Chokroverty S. Seizures in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1989; 39: 138-40.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 1063-70.
- Palop JJ, Chin J, Mucke L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 768-73.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 2007; 55: 697-711.
- Palop JJ, Mucke L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2009; 66: 435-40.
- Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 2010; 13: 812-8.

- Palop JJ, Mucke L. Synaptic depression and aberrant excitatory network activity in Alzheimer's disease: two faces of the same coin? *Neuromolecular Med* 2010b; 12: 48-55.
- Panagopoulos NT, Kazanis E, Sotiriou E, Papanastasiou P, Matsokis NA. Effect of the pentylenetetrazole (PTZ) induced seizures on the gabaergic system in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10: 48.
- Pei YQ, Koyama I. Features of seizures and behavioral changes induced by intrahippocampal injection of zinc sulfate in the rabbit: a new experimental model of epilepsy. *Epilepsia* 1986; 27: 183-8.
- Peng Z, Houser CR. Temporal patterns of fos expression in the dentate gyrus after spontaneous seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2005; 25: 7210-20.
- Pereno G, Beltramino C. [Understanding the pathophysiology of epilepsy in an animal model: pentylenetetrazole induces activation but not death of neurons of the medial extended amygdala]. *Neurologia* 2010; 25: 148-55.
- Perez M, Hernandez F, Gomez-Ramos A, Smith M, Perry G, Avila J. Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur J Biochem* 2002; 269: 1484-9.
- Perez M, Ribe E, Rubio A, Lim F, Moran MA, Ramos PG, et al. Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. *Neuroscience* 2005; 130: 339-47.
- Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 503-33.
- Pitkanen A, Tuunanen J, Kalviainen R, Partanen K, Salmenpera T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1998; 32: 233-53.
- Pitkanen A. S, P. A. , Moshé, S. L. . Models of seizures and epilepsy. Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2006.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 3-33.
- Puri R, Ganesh S. Laforin in autophagy: a possible link between carbohydrate and protein in Lafora disease? *Autophagy* 2010; 6: 1229-31.
- Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, et al. Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122: 1707-11.
- Reinhard JF, Reinhard JFJ. Experimental evaluation of anticonvulsants. Anticonvulsants. New York: Academic Press, 1977: 57-111.
- Reddy PH, Williams M, Charles V, Garrett L, Pike-Buchanan L, Whetsell WO, Jr., et al. Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet* 1998; 20: 198-202.
- Ridley RM. The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Prog Neurobiol* 1994; 44: 221-31.
- Risse SC, Lampe TH, Bird TD, Nochlin D, Sumi SM, Keenan T, et al. Myoclonus, seizures, and paratonia in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1990; 4: 217-25.
- Rissman RA, De Blas AL, Armstrong DM. GABA(A) receptors in aging and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2007; 103: 1285-92.
- Roach PJ. Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med* 2002; 2: 101-20.
- Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 2007; 316: 750-4.

- Roger J, Genton P, Bureau M, C. D. Progressive myoclonus epilepsies in childhood and adolescence. In: Roger J, Bureau M, Dravet C, Dreifuss FE, Perret A and Wolf P, editors. *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. London: John Libbey, 1992: 381-400.
- Romanelli MF, Morris JC, Ashkin K, Coben LA. Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures. *Arch Neurol* 1990; 47: 847-50.
- Rothman SM, Mattson MP. Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2010; 12: 56-70.
- Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends Neurosci* 1995; 18: 57-8.
- Rozas G, Lopez-Martin E, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods* 1998; 83: 165-75.
- Sainz J, Minassian BA, Serratosa JM, Gee MN, Sakamoto LM, Iranmanesh R, et al. Lafora progressive myoclonus epilepsy: narrowing the chromosome 6q24 locus by recombinations and homozygosities. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1205-9.
- Sakai M, Austin J, Witmer F, Trueb L. Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). II. Polyglucosans in the systemic deposits of myoclonus epilepsy and in corpora amylacea. *Neurology* 1970; 20: 160-76.
- Scarmeas N, Honig LS, Choi H, Cantero J, Brandt J, Blacker D, et al. Seizures in Alzheimer disease: who, when, and how common? *Arch Neurol* 2009; 66: 992-7.
- Scott SA, DeKosky ST, Sparks DL, Knox CA, Scheff SW. Amygdala cell loss and atrophy in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1992; 32: 555-63.
- Schauwecker PE. The relevance of individual genetic background and its role in animal models of epilepsy. *Epilepsy Res* 2011; 97: 1-11.
- Schaul N. The fundamental neural mechanisms of electroencephalography. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1998; 106: 101-7.
- Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 1999; 38: 3549-58.
- Schwarz GA, Yanoff M. Lafora's Disease. Distinct Clinico-Pathologic Form of Unverricht's Syndrome. *Arch Neurol* 1965; 12: 172-88.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-66.
- Sengupta S, Badhwar I, Upadhyay M, Singh S, Ganesh S. Malin and laforin are essential components of a protein complex that protects cells from thermal stress. *J Cell Sci* 2011; 124: 2277-86.
- Serratosa JM, Delgado-Escueta AV, Posada I, Shih S, Drury I, Berciano J, et al. The gene for progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type maps to chromosome 6q. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1657-63.
- Serratosa JM, Gomez-Garre P, Gallardo ME, Anta B, de Bernabe DB, Lindhout D, et al. A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum Mol Genet* 1999; 8: 345-52.
- Sharma J, Rao SN, Shankar SK, Satishchandra P, Jana NR. Lafora disease ubiquitin ligase malin promotes proteasomal degradation of neuronatin and regulates glycogen synthesis. *Neurobiol Dis* 2011; 44: 133-41.
- Shea L, Raben N. Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009; 47 Suppl 1: S42-7.

- Shitak R, Sahai AK, Hota D, Chakrabarti A. Anti-seizure efficacy of nimodipine in pentylenetetrazole and kainic acid combined seizure models in mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006; 50: 265-72.
- Singh S, Ganesh S. Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes. *Hum Mutat* 2009; 30: 715-23.
- Singh S, Satishchandra P, Shankar SK, Ganesh S. Lafora disease in the Indian population: EPM2A and NHLRC1 gene mutations and their impact on subcellular localization of laforin and malin. *Hum Mutat* 2008; 29: E1-12.
- Singh S, Suzuki T, Uchiyama A, Kumada S, Moriyama N, Hirose S, et al. Mutations in the NHLRC1 gene are the common cause for Lafora disease in the Japanese population. *J Hum Genet* 2005; 50: 347-52.
- Slack FJ, Ruvkun G. A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 474-5.
- Snead OC, 3rd, Banerjee PK, Burnham M, Hampson D. Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci* 2000; 20: 6218-24.
- Snider BJ, Norton J, Coats MA, Chakraborty S, Hou CE, Jervis R, et al. Novel presenilin 1 mutation (S170F) causing Alzheimer disease with Lewy bodies in the third decade of life. *Arch Neurol* 2005; 62: 1821-30.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1051-8.
- Solaz-Fuster MC, Gimeno-Alcaniz JV, Ros S, Fernandez-Sanchez ME, Garcia-Fojeda B, Criado Garcia O, et al. Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 667-78.
- Sperfeld AD, Collatz MB, Baier H, Palmbach M, Storch A, Schwarz J, et al. FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Ann Neurol* 1999; 46: 708-15.
- Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol* 1998; 8: 387-402.
- Stone WE. Convulsant actions of tetrazole derivatives. *Pharmacology* 1970; 3: 367-70.
- Swinyard EA, Woodhead, J.H., White, H.S., and Franklin, M.R. Experimental selection, quantification, and evaluation of anticonvulsants. *Antiepileptic drugs*. New York: Raven Press, 1989: 85-102.
- Tagliabracci VS, Girard JM, Segvich D, Meyer C, Turnbull J, Zhao X, et al. Abnormal metabolism of glycogen phosphate as a cause for Lafora disease. *J Biol Chem* 2008; 283: 33816-25.
- Tagliabracci VS, Turnbull J, Wang W, Girard JM, Zhao X, Skurat AV, et al. Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 19262-6.
- Turnbull J, DePaoli-Roach AA, Zhao X, Cortez MA, Pencea N, Tiberia E, et al. PTG depletion removes Lafora bodies and rescues the fatal epilepsy of Lafora disease. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002037.
- Turnbull J, Wang P, Girard JM, Ruggieri A, Wang TJ, Draginov AG, et al. Glycogen hyperphosphorylation underlies lafora body formation. *Ann Neurol* 2010; 68: 925-33.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983; 9: 315-35.

- Valles-Ortega J, Duran J, Garcia-Rocha M, Bosch C, Saez I, Pujadas L, et al. Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease. *EMBO Mol Med* 2011; 3: 667-81.
- Van Heycop Ten Ham MW. Lafora disease, a form of progressive myoclonus epilepsy. In: P.J. Vinken and Bruyn GW, editors. *The Epilepsies. Handbook of Clinical Neurology*. Vol 15. North-Holland, Amsterdam, 1974: 382–422.
- Velis D, Plouin P, Gotman J, da Silva FL. Recommendations regarding the requirements and applications for long-term recordings in epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48: 379-84.
- Velisek L, Moshé SL. Penicillins. In: Schaumburg PSSaHH, editor. *Experimental and clinical neurotoxicology*. New York: Oxford University Press, 2000: 948-951.
- Verdinakis A, and Woodbury, D. Maturation factors in development of seizures. In: H. Jasper AW, and A. Pope., editor. *Mechanisms of the Epilepsies*. Boston: Little, Brown, 1969: 535-541.
- Vernadakis A, Woodbury DM. The developing animal as a model. *Epilepsia* 1969; 10: 163-78.
- Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Valles J, Garcia-Fojeda B, et al. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1407-13.
- Vogt DL, Thomas D, Galvan V, Bredesen DE, Lamb BT, Pimplikar SW. Abnormal neuronal networks and seizure susceptibility in mice overexpressing the APP intracellular domain. *Neurobiol Aging* 2009; 32: 1725-9.
- Wang J, Stuckey JA, Wishart MJ, Dixon JE. A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen. *J Biol Chem* 2002; 277: 2377-80.
- Webb AA, McMillan C, Cullen CL, Boston SE, Turnbull J, Minassian BA. Lafora disease as a cause of visually exacerbated myoclonic attacks in a dog. *Can Vet J* 2009; 50: 963-7.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 1858-62.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 1994; 344: 769-72.
- Westmark CJ, Westmark PR, Beard AM, Hildebrandt SM, Malter JS. Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 157-68.
- Woodbury DM, Glaser GH, Penry JK, Woodbury DM. *Convulsant Drugs: Mechanism of Action*. Advances in Neurology. Vol 27: Raven Press, New York, 1980: 249–303.
- Worby CA, Gentry MS, Dixon JE. Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J Biol Chem* 2006; 281: 30412-8.
- Worby CA, Gentry MS, Dixon JE. Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG). *J Biol Chem* 2008; 283: 4069-76.
- Yamaoka LH, Welsh-Bohmer KA, Hulette CM, Gaskell PC, Jr., Murray M, Rimmler JL, et al. Linkage of frontotemporal dementia to chromosome 17: clinical and neuropathological characterization of phenotype. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1306-12.

- Yang R, Cao L, Gasa R, Brady MJ, Sherry AD, Newgard CB. Glycogen-targeting subunits and glucokinase differentially affect pathways of glycogen metabolism and their regulation in hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 1514-23.
- Yokoi S, Austin J, Witmer F, Sakai M. Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). I. Isolation and preliminary characterization of Lafora bodies in two cases. *Arch Neurol* 1968; 19: 15-33.
- Zaczek R, Nelson M, Coyle JT. Kainic acid neurotoxicity and seizures. *Neuropharmacology* 1981; 20: 183-9.
- Zarranz JJ, Ferrer I, Lezcano E, Forcadass MI, Eizaguirre B, Atares B, et al. A novel mutation (K317M) in the MAPT gene causes FTDP and motor neuron disease. *Neurology* 2005; 64: 1578-85.

## **ANEXO**